

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
21. September 2006 (21.09.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/097320 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/002461

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. März 2006 (17.03.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 012 301.5 17. März 2005 (17.03.2005) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): GENOVOXX GMBH [—/DE]; Maria-Göppert-Str.
1, ICL, 23562 Lübeck (DE).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: CHERKASOV, Dmitry [RU/DE]; Moisliger
Mühlenweg 21, 23560 Lübeck (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BÄUML, Englbert
[DE/DE]; An der Münze 14., 23627 Gross Grönau (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: CHERKASOV, Dmitry;
Moisliger Mühlenweg 21, 23560 Lübeck (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MACROMOLECULAR NUCLEOTIDE LINKS AND METHODS FOR THEIR USE

(54) Bezeichnung: MAKROMOLEKULARE NUKLEOTIDVERBINDUNGEN UND METHODEN ZU DEREN ANWEN-
DUNG

(57) Abstract: The invention relates to the structure, production and use of modified nucleotide and nucleoside building blocks, (nuc-macromolecules).

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Struktur, die Herstellung und die Verwendung modifizierter Nukleotid- und Nukleostdbausteine, die „Nuk-Makromoleküle“.

WO 2006/097320 A2

Makromolekulare Nukleotidverbindungen und Methoden zu deren Anwendung

5 Beschreibung der Erfindung

1. Einführung

1.1 Einordnung in das technologische Feld

10 In einer Ausführung bezieht sich die Erfindung auf die Struktur, die Herstellung und die Verwendung modifizierter Nukleotid- und Nukleosidbausteine, im folgenden „Nuk-Makromoleküle“.

1.2 Stand der Technik:

15 Niedermolekulare Stoffe spielen eine wichtige Rolle in lebendigen Organismen. Sie dienen Beispielsweise als Bausteine von Polymeren, als Botenstoffe, als Energieträger. In der Diagnostik werden sie zur Bestimmung von medizinisch relevanter Parameter eingesetzt. Dabei werden diese Stoffe oft mit bestimmten Signal-Trägern markiert. Ein Beispiel für die niedermolekularen Stoffe bieten Nukleotide und Nukleoside.

20

Sie spielen ebenfalls eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen der lebenden Organismen ("Biochemie und Pathobiochemie", G. Löffler, 2003) und stellen in der modernen Biotechnologie verbreitete Elemente dar ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5), beispielsweise für künstliche
25 Detektionssysteme ("DNA Microarrays", Bowtell, 2003, ISBN 0-87969-624-9, "Microarray-Biochip Technology" M Schena, 2000, ISBN 1-881299-37-6). Aus diesem Grund werden modifizierte Nukleotide, Nukleotid-Analoga, in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie, Medizin und Pharmakologie eingesetzt ("Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry",
30 Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997).

Eines der wichtigsten Felder der modernen Life-Science sind Analysen der Nukleinsäuren. Ein großer Bereich dieser Analysen befasst sich mit dem Nachweis der
35 Nukleinsäuren oder deren Bestandteilen im biologischen Präparat. In vielen Fällen wird zu diesem Zweck ein Reaktionspartner markiert, der mit der zu analysierenden Nukleinsäure reagieren kann. Dem Fachmann sind unterschiedliche Möglichkeiten zur Markierung der Nukleinsäuren bekannt. Einerseits können einzelne

Nukleinsäurebausteine, Nukleotide bzw. Nukleoside modifiziert sein, andererseits können kurze Fragmente von Nukleinsäuren, Oligonukleotide oder Polynukleotide zum Nachweis eingesetzt werden.

- 5 Konventionell modifizierte Nukleotide sind beispielsweise in Lee et al. Nucleic acid research 1992, V. 20, S.2471; Augustin et. al. J. Biotechnology 2001 V. 86, S.289-301; US Patent 4828979; Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30, S. 3857 beschrieben. Diese Nukleotide haben einen niedermolekularen detektierbaren Teil, der
10 direkt (wie beispielsweise ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül) oder indirekt detektiert werden kann (wie beispielsweise bei einem Biotin-Molekül, das erst nach Kopplung mit einem Streptavidin-Farbstoff-Konjugat nachgewiesen wird). Solche Nukleotide stellen Beispiele für die Stand der Technik der Nukleotid-Modifikationen dar. Viele modifizierte Nukleotide können kommerziell erworben werden, z.B. von NEN Life Science Products (Biotin-11-dUTP, DNP-11-dATP, Fluorescein-12-dCTP), von Amersham Bioscience (dCTP-Cy3, dCTP-Cy5) oder von Roche (Biotin-16-dUTP). Entsprechende
15 Nachweisreagenzien, z.B. markiertes Streptavidin, markierte Antikörper, können von den selben Anbietern bezogen werden.

- 20 Zur Vereinfachung der Darstellung werden im Folgenden modifizierte Nukleotide besprochen. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass auch modifizierte Nukleoside für die enzymatische und nicht enzymatische Synthesen eingesetzt werden können, konventionell modifizierte Nukleoside sind erhältlich beispielsweise bei Trillink Biotechnologies oder Eurogentec.

- 25 Konventionell modifizierte Nukleotide haben ein äquimolares Verhältnis zwischen der Nukleotid-Komponente und dem niedermolekularen detektierbaren Teil, z.B. Farbstoff-Molekül bzw. Biotin-Molekül. Zwischen beiden Teilen liegt ein Linker mit einer durchschnittlichen Länge von 5 - 30 Atomen.

- 30 Solche Nukleotide können von Polymerasen in den wachsenden Strang eingebaut werden und somit ein signaltragendes Molekül (Farbstoff) oder signalvermittelndes Molekül (Biotin oder Digoxigenin) in die Nukleinsäurekette einführen. Nach dem Einbau von modifizierten Nukleotiden kann die Signaldetektion im Fall von farbstoffmarkierten Nukleotiden direkt erfolgen oder nach Inkubation mit einem sekundären signaltragenden Molekül (z.B. Streptavidin-Farbstoff-Konjugat im Fall von Biotin), wenn signalvermittelnde Moleküle verwendet werden. Die nachträgliche
35 Kopplung der signaltragenden Moleküle, wie Streptavidin, erfolgt oft mit unzureichenden Ausbeuten von 20-60%.

Sehr oft werden bei der Markierung der Nukleinsäuren Signalvervielfältigungsschritte eingesetzt. Diese können auf unterschiedlichen Stufen der Analyse durchgeführt werden. Beispiele dafür stellen Materialvervielfältigung (PCR), mehrfacher Einbau von markierten Nukleotiden, mehrstufige nachträgliche Markierung von Biotin-Nukleotiden
5 ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5). Diese Verfahren führen zu einer Verzerrung der Signale, da sie aus mehreren, oft ungenügend kontrollierten Schritten bestehen, die mit unterschiedlichen Ausbeuten ablaufen und von vielen Faktoren beeinflusst werden können.

10 Bestimmte Verfahren, beschrieben beispielsweise in Seeger WO 0018956, Kartalov WO02072892, sind auf die Detektion der Signale von einzelnen Nukleotid-Molekülen angewiesen. Beim Einsatz konventioneller Nukleotide beeinflussen mehrere Phänomene wie z.B. das Ausbleichen der Farbstoffe oder Blinking die Ergebnisse der Einzelmoleküldetektion. Für solche Verfahren bedeutet eine Steigerung von
15 Signalstärke und Intensität der Nukleotidmarkierung eine Verringerung der Fehlerrate bei der Detektion.

Es besteht somit ein Bedarf an modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden mit einer verbesserten signalgebenden oder signalvermittelnden Wirkung, insbesondere für
20 deren Einsatz zur Markierung von Nukleinsäuren bei der Nukleinsäureanalyse.

Aufgaben der Erfindung:

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist folglich die Bereitstellung von
25 modifizierten Nukleotiden oder Nukleosiden, die ihre Substrateigenschaften für Polymerasen oder andere Enzyme beibehalten und nach ihrem Einbau in die Nukleinsäuren eine verbesserte Signalintensität bei deren Analyse gewährleisten.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung von Verfahren zur Markierung
30 von Nukleinsäuren mit erfindungsgemäß modifizierten Nukleotiden.

Die vorliegende Erfindung beschreibt in einer Ausführungsform eine neue Klasse an modifizierten Nukleotiden, die Nuk-Makromoleküle. Nuk-Makromoleküle sind dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Nukleotid-Komponenten mit einem oder
35 mehreren signalgebenden oder signalvermittelnden makromolekularen Komponenten (Marker) über einen Linker verbunden sind. Die jeweilige Nuk-Komponente bewahrt in einem Nuk-Makromolekül seine Substratfunktion für Enzyme. Eine signalgebende makromolekulare Komponente trägt beispielsweise mehrere Farbstoffmoleküle.

Nuk-Makromoleküle können wie konventionell modifizierte Nukleotide in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie und Medizin verwendet werden. Im Folgenden sollte lediglich als Beispiel deren Einsatz für die Nukleinsäuremarkierung dargestellt werden. Andere Einsatzbereiche der Nuk-Makromoleküle sind dem Fachmann bereits bekannt s.o.

1.3 Begriffe / Definitionen:

1.3.1. Makromolekulare Verbindung - ein Molekül, oder ein Molekülkomplex, oder ein Nanokristall oder ein Nanoteilchen, dessen Masse zwischen 2kDa und 20kDa, 2kDa und 50kDa, 2kDa und 100kDa, 100kDa und 200kDa, 200kDa und 1000kDa oder 1MDa und 100MDa oder 100 MDa und 100GDa liegt. Beispiele für makromolekulare Verbindungen sind Nukleinsäuren, wie Oligonukleotide mit einer Länge von mehr als 10 Nukleotiden, Polynukleotide, Polypeptide, Proteine oder Enzyme, Quantum Dots, Polymere wie PEG, Mowiol, Dextran, Polyacrylat, Nanogold-Partikel aber auch Komplexe, die aus mehreren Makromolekülen bestehen.

1.3.2. Niedermolekulare Verbindung - ein Molekül oder ein Molekülkomplex, dessen Masse kleiner 2000 Da (2kDa) beträgt, z.B. Biotin, natürliche Nukleotide, dATP, dUTP, viele Farbstoffe, wie Cy3, Rhodamine, Fluorescein und konventionell modifizierte Nukleotide, wie Biotin-16-dUTP.

1.3.3. Ein Nuk-Makromolekül im Sinne dieser Anmeldung ist eine chemische Struktur, die eine oder mehrere Nuk-Komponenten, eine oder mehrere Linker-Komponenten und eine Marker-Komponente einschließt, Fig. 1 oder 2:

$(\text{Nuk-Linker})_n\text{-Marker}$

wobei:

- Nuk - eine Nuk-Komponente ist
- Linker - eine Linker-Komponente ist
- Marker - eine Marker-Komponente ist
- n - eine Zahl von 1 bis 1000 ist

In einer Ausführungsform der Erfindung ist Linker wasserlöslich. Seine Zusammensetzung ist nicht eingeschränkt, solange die Substrat-Eigenschaften der Nukleotide nicht verloren gehen. Seine Länge liegt zwischen 2 und 100.000 Atome.

In einer weiteren Ausführungsform besteht die Linker-Komponente aus einer Kopplungseinheit L für die Kopplung des Linkers an die Nuk-Komponente, aus einem wasserlöslichen Polymer und aus einer Kopplungseinheit T für die Kopplung des
 5 Linkers an die Marker-Komponente. In dieser bevorzugten Ausführungsform hat ein Nuk-Makromolekül folgende Struktur, Fig. 1 oder 2:



10 wobei:

- Nuk - ein Nukleotid- oder ein Nukleosid-Monomer ist (Nuk-Komponente)
- L - ein Teil des Linkers ist, das die Verbindung zwischen Nuk und dem Linkerrest darstellt (Kopplungseinheit L)
- 15 T - ein Teil des Linkers ist, das die Verbindung zwischen dem Linkerrest und dem Marker darstellt (Kopplungseinheit T)
- Polymer - ein Teil des Linkers ist, das ein wasserlösliches Polymer mit einer durchschnittlichen Länge zwischen 5 und 100.000 Atome ist
 (Kopplungseinheit L, Polymerlinker, Kopplungseinheit T sind bei dieser Ausführungsform als Linker-Komponente zusammengefaßt)
- 20 Marker - eine Marker-Komponente
- n - eine Zahl von 1 bis 1000, wobei (n) einen durchschnittlichen Wert darstellen kann.

1.3.3.1 Nuk-Komponente

- 25 Nuk-Komponente kann sowohl ein Nukleotid als auch ein Nukleosid darstellen. Im folgenden werden bei der Beschreibung Nukleotide betrachtet. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass auch Nukleoside in entsprechender Weise modifiziert und in entsprechenden Reaktionen werden können.
- 30 In einer Ausführungsform ist Nuk-Komponente ein Nukleotid- oder ein Nukleosid-Monomer, das mit der Linker-Komponente gekoppelt ist. Prinzipiell können alle als Substrat für Nukleotid-akzeptierende Enzyme geeigneten konventionellen Nukleotid-Varianten als Nuk-Komponente des Nuk-Makromoleküls dienen, so dass sowohl natürliche als auch modifizierte Nukleotide (Nukleotid-Analoga) für die Nuk-
- 35 Komponente in Frage kommen. Bei modifizierten Nukleotiden können Base-, Zucker- oder Phosphat-Teile modifiziert werden, Fig. 3. Viele Beispiele für Nukleotid-Modifikationen sind dem Fachmann bekannt ("Advanced organic chemistry of nucleic acids", 1994, Shabarova, ISBN 3-527-29021-4, "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980,

ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997) im Text werden auch weitere Beispiele für die Modifikationen der Nukleotide angegeben.

- 5 Die Nuk-Komponente schließt vorzugsweise eine Base-Komponente (Base), eine Zucker-Komponente (Zucker) und wahlweise eine Phosphat-Komponente (Phosphat) ein. Base, Zucker und Phosphat können modifiziert sein, d.h. die Grundstruktur sieht den natürlichen Nukleotiden oder Nukleosiden ähnlich, trägt aber beispielsweise zusätzliche chemische Gruppen. Beispiele für Kombinationen aus verschiedenen
- 10 Komponenten sind dem Fachmann bekannt. Solche Nuk-Komponenten können in vielen enzymatischen und chemischen Reaktionen eingesetzt werden (G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-).

- 15 In einer anderen Ausführungsform ist eine Nuk-Komponente mit weiteren Nukleotiden gekoppelt, z.B. in einer Nukleinsäurekette. Dabei tritt die Nuk-Komponente als ein Monomer eines Polymers auf.

1.3.3.1.1 Variationen am Phosphat

- 20 In einer Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid dar. In einer anderen Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Monophosphat dar. In einer anderen Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Diphosphat dar. In einer weiteren Ausführungsform stellt die Nuk-Komponente ein Nukleosid-Triphosphat dar. Auch höhere Phosphat-Derivate (Tetraphosphat usw.) können verwendet werden.

- 25 Die genannten Phosphatmodifikationen können wie bei Nukleosid-Triphosphaten an der 5'-Position oder auch an anderen Positionen des Zucker-Teils des Nukleotides sitzen, beispielsweise an der 3'-Position.

- Wahlweise kann die Phosphat-Komponente Modifikationen einschließen, solche Modifikationen schließen beispielsweise in einer Ausführungsform einen Linker ein (D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, S. 363-, A. Draganescu et al. J. Biol.Chem. 2000 v.275, 4555-). In einer weiteren Ausführungsform schließt die
- 30 Phosphat-Komponente der Nuk-Komponente Thiotriphosphat-Verbindungen ein (Burgess et al. PNAS 1978 v. 75, S. 4798-).

- 35 In einer weiteren Ausführungsform schließt die Phosphat-Komponente der Nuk-Komponente geschützte Phosphat-Gruppen (z.B. Phosphoroamidite) ein.

In einer Ausführungsform stellt die Phosphat-Komponente die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente der Nuk-Makromoleküle dar.

1.3.3.1.2 Variationen an der Base

Die Nuk-Komponente kann ein in der Natur in den Nukleinsäuren vorkommendes Nukleotid oder Nukleosid oder seine Analoga darstellen, vorzugsweise die an Watson-Crick-Paarbildung teilnehmern, beispielsweise Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin, Uracil, Inosin, oder eine modifizierte Base, wie z.B. 7-Deazaadenin, 7-Deazaguanin, 6-Thioadenin, einschließen, Literatur s. oben. Wahlweise kann die Base Modifikationen einschließen, solche Modifikationen schließen beispielsweise in einer Ausführungsform einen an die Base gekoppelten Linker wie beispielsweise ein Amino-propargyl-Linker oder ein Amino-Allyl-Linker ein, weitere Beispiele für die Linker sind bekannt (Ward et al. US Pat 4711955, G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-, Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US Pat. 4,828,979, Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP 0286028, Hanna M. Method in Enzymology 1996 v.274, S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391, Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284). In einer Ausführungsform stellt der an die Base gekoppelte Linker die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente der Nuk-Makromoleküle dar. Weitere Modifikationen an der Base sind beispielsweise im Katalog von Trilink Biotechnologies, Inc. San Diego, USA, Ausgabe 2003 auf Seite 38 aufgeführt.

1.3.3.1.3 Variationen am Zucker

Dem Fachmann sind verschiedene Variationen der Zucker-Komponente der Nukleotide bekannt, die z.B. in der Diagnostik, Therapie oder Forschung eingesetzt werden. Solche Variationen schließen z.B. Ribose, 2'-Deoxyribose oder 2',3'-Dideoxyribose ein. Wahlweise kann die Zucker-Komponente Modifikationen einschließen (M. Metzger et al. Nucleic Acid Research 1994, V. 22, 4259-, Tsien WO 91/06678), solche Modifikationen schließen beispielsweise in einer Ausführungsform einen Linker ein. Die modifizierende Gruppe oder Linker kann beispielsweise reversibel an die Zucker-Komponente gekoppelt sein (Hovinen et al. J.Chem.Soc.Prking Trans. 1994, S. 211-, Canard US Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Ju et al. US Pat. 6664079, Fahnestock et al. WO 91066678, Cheeseman US Pat. 5302509, Parce et al. WO 0050642, Milton et al. WO 2004018493, Milton et al. 2004018497). In einer Ausführungsform stellt der an die Zucker-Komponente gekoppelte Linker die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente der Nuk-Makromoleküle dar.

In einer weiteren Ausführungsform schließt die Zucker-Komponente z.B. folgende Modifikationen ein: wahlweise kann die 3'- oder die 2'-OH-Gruppen durch folgende Atome oder Gruppen ersetzt werden: Halogenatome, Wasserstoff, Amino-, Merkapto- oder Azido-Gruppe (Beabealashvilli et al. Biochem Biophys Acta 1986, v.868, 136-,
5 Yuzhanov et al. FEBS Lett. 1992 v. 306, 185-).

In einer weiteren Ausführungsform schließt die Nuk-Komponente azyklische Nukleotid- oder Nukleosid-Modifikationen ein (A. Holy Current Pharmaceutical Design 2003 v. 9, 2567-, G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-). In einer weiteren
10 Ausführung kann die Zucker-Komponente eine Doppelbindung einschließen.

In der Anmeldung werden 2'-Deoxynukleotide, beispielsweise 2'-Deoxyuridin-Triphosphat, 2'-Deoxycytidin-Triphosphat, 2'-Deoxyadenosin-Triphosphat, 2'-Deoxyguanosin-Triphosphat als dUTP, dCTP, dATP und dGTP bezeichnet.

15 1.3.3.1.4 Kopplung von NT und Linker

Die Nuk-Komponente ist an einer Kopplungsstelle mit dem Linker verbunden. Die Kopplungsstelle des Linkers an die Nuk-Komponente kann sich an der Base, am Zucker (Ribose bzw. Deoxyribose), oder am Phosphat-Teil befinden.

20 Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und der Nuk-Komponente ist vorzugsweise kovalent.

Wenn die Kopplungsstelle an der Base liegt, so befindet sie sich vorzugsweise an den Positionen 4 oder 5 bei Pyrimidin-Basen und an den Positionen 6,7,8 bei den Purin-Basen (Ward et al. US Pat 4711955, G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-, Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US Pat. 4,828,979, Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP 0286028, Hanna M. Method in Enzymology 1996 v.274, S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391,
25 Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284). Am Zucker können die Positionen 2', 3', 4' oder 5' die Kopplungsstellen darstellen. Die Kopplung an die Phosphatgruppen kann an der alpha, beta, oder gamma-Phosphatgruppe erfolgen. Beispiele für die Kopplungsstelle an der Base sind in Short WO 9949082, Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382 (siehe auch kommerziell erhältliche Nukleotide
30 (Amersham, Roche), an der Ribose in Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parçe WO
35

0050642., an Phosphatgruppen in Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363 beschrieben.

Die Position der Kopplungsstelle hängt vom Einsatzgebiet der NT-Makromoleküle ab. So werden beispielsweise für die Markierung von Nukleinsäuren, die am Nukleinsäurestrang verbleiben soll, vorzugsweise Kopplungsstellen am Zucker oder an der Base verwendet. Die Kopplung an die Gamma- oder Beta-Phosphatgruppen kann beispielsweise dann erfolgen, wenn die Markierung beim Einbau des Nuk-Makromoleküls freigesetzt werden soll.

Die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente erfolgt beispielsweise über eine Kopplungseinheit (L), die ein Teil der Linker-Komponente ist.

Die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C, für pH-Bereiche zwischen 1 und 14, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Proteasen, Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

Diese spaltbare Verbindung ermöglicht die Entfernung der Linker- und der Marker-Komponenten. Dies kann beispielsweise in den Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese von Bedeutung sein, wie Pyrosequencing, BASS (Canard et al. US Patent 5.798.210, Rasolonjatovo Nucleosides & Nucleotides 1999, V.18 S.1021, Metzker et al. NAR 1994, V.22, S.4259, Welch et al. Nucleosides & Nucleotides 1999, V.18, S.19, Milton et al. WO 2004018493, Odedra et al. WO 0192284) oder single molecule sequencing, Tcherkassov WO 02088382. Ihre Wahl ist nicht eingeschränkt, sofern sie unter den Bedingungen der enzymatischen Reaktion stabil bleibt, keine irreversible Störung der Enzyme (z.B. Polymerase) verursacht und unter milden Bedingungen abgespalten werden kann. Unter "milden Bedingungen" sind solche Bedingungen zu verstehen, die zum Beispiel Nukleinsäure-Primer-Komplexe nicht zerstören, wobei z.B. der pH-Wert vorzugsweise zwischen 3 und 11 und die Temperatur zwischen 0°C und einem Temperaturwert (x) liegt. Dieser Temperaturwert (x) hängt von der T_m des Nukleinsäure-Primer-Komplexes (T_m ist der Schmelzpunkt) und wird beispielsweise als T_m (Nukleinsäure-Primer-Komplex) minus 5°C errechnet (z.B. T_m ist 47°C, dann liegt die maximale Temperatur bei 42°C; unter diesen Bedingungen eignen sich besonders Ester-, Thioester-, Acetale, Phosphoester-, Disulfid-Verbindungen und photolabile Verbindungen als spaltbare Verbindungen).

Vorzugsweise gehört die genannte spaltbare Verbindung zu chemisch oder enzymatisch spaltbaren oder photolabilen Verbindungen. Als Beispiele von chemisch spaltbaren Gruppen sind Ester-, Thioester-, Disulfid-, Acetal-Verbindungen bevorzugt (Short WO 9949082, „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc., Herman et al. Method in Enzymology 1990 V.184 S.584, Lomant et al. J.Mol.Biol. 1976 V.104 243, "Chemistry of carboxylic acid and esters" S.Patai 1969 Interscience Publ.). Beispiele für photolabile Verbindungen können in folgenden Literaturstellen gefunden werden: Rothschild WO 9531429, "Protective groups in organic synthesis" 1991 John Wiley & Sons, Inc., V. Pillai Synthesis 1980 S.1, V. Pillai Org. Photochem. 1987 V.9 S.225, Dissertation „Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese“ H.Giegrich, 1996, Konstanz, Dissertation „Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese“ S.M.Bühler, 1999, Konstanz)..

1.3.3.1.5 Zahl der gekoppelten Nuk-Komponenten

In einer Ausführungsform der Erfindung ist pro ein Nuk-Makromolekül nur eine Nuk-Komponente gekoppelt. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung sind mehrere Nuk-Komponenten pro Nuk-Makromolekül gekoppelt. Mehrere Nuk-Komponenten können einheitlich oder unterschiedlich sein, wobei beispielsweise durchschnittlich 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 25, 25 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 250, 250 bis 500, 500 bis 1000 Nuk-Komponenten pro ein Nuk-Makromolekül gekoppelt sein können.

1.3.3.2 Linker-Komponente

Die Bezeichnung Linker oder Linker-Komponente wird synonym in der Anmeldung verwendet und bezieht sich auf den gesamten strukturellen Abschnitt des Nuk-Makromoleküls zwischen der Nuk-Komponente und der Marker-Komponente. Der Linker ist vorzugsweise wasserlöslich. Die genaue Linkerzusammensetzung ist nicht eingeschränkt und kann variieren.

In einer bevorzugten Form haben Nuk-Makromoleküle einen kurzen Linker. Seine Länge beträgt zwischen 2 und 30 Kettenatomen. Solche Linker können funktionelle Gruppen tragen, wie beispielsweise Amino-, Carboxy-, Mercapto- und Hydroxygruppen. An diese Gruppen können weitere Moleküle, z.B. Makromoleküle, wie wasserlösliche Polymere, gekoppelt werden. Beispiele von kurzen Linkern gekoppelt an Nukleotide sind dem Fachmann bekannt (Ward et al. US Pat 4711955, G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447-, Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US Pat. 4,828,979, Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP

0286028, Hanna M. Method in Enzymology 1996 v.274, S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391, Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284). Der

5 Linker kann eine oder mehrere Einheiten von wasserlöslichen Polymeren enthalten, wie beispielsweise Aminosäuren, Zucker, PEG-Einheiten oder Carbonsäuren. Weitere Beispiele für kurze Linker kann die Kopplungseinheit (L) eines langen Linkers dienen s.u. Linker mit der Länge zwischen 2 und 20 Atome, werden vorzugsweise in Nuk-Makromolekülen eingesetzt, deren Marker-Komponente lineare wasserlösliche
10 Polymere aufweist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein langer Linker eingesetzt, mit eine Länge von mehr als 30 Ketten-Atomen.

15 Nachfolgend werden Beispiele für die Zusammensetzung der Linker angeführt.

1.3.3.2.1 Linker-Bestandteile

Die Linker-Komponente stellt einen Teil des Nuk-Makromoleküls dar, der zwischen der jeweiligen Nuk-Komponente und der Marker-Komponente liegt.

20

Die Linker-Komponente hat in ihrer Struktur beispielsweise folgende Bestandteile:

- 1) Kopplungseinheit L
- 2) wasserlösliches Polymer
- 3) Kopplungseinheit T

25

Die Aufteilung der Linker-Komponente in einzelne Bestandteile ist rein funktionell und soll lediglich der Anschaulichkeit der Struktur dienen. Je nach Betrachtungsweise können einzelne Strukturen des Linkers zum einen oder zum anderen Bestandteil gerechnet werden.

30

Die Kopplungseinheit L hat die Funktion, die Linker-Komponente und die Nuk-Komponente zu verbinden. Bevorzugt sind kurze, unverzweigte Verbindungen, von 1 bis 20 Atome in der Länge. Die jeweilige Struktur der Kopplungseinheit L hängt von der Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid und von dem jeweiligen Polymer des
35 Linkers ab. Einige Beispiele für die Kopplungseinheiten L sind in Beispielen 1 bis 33 angegeben. Viele konventionell modifizierte Nukleotide tragen einen kurzen Linker, diese kurzen Linker dienen als weitere Beispiele für die Kopplungseinheit L, z.B. kurze Linker an der Base: Short WO 9949082, Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov

WO 02088382 (siehe auch kommerziell erhältliche Nukleotide (Amersham, Roche), kurze Linker an der Ribose in Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Ju et al. US Pat. 6664079, Parce WO 0050642., kurze Linker an Phosphatgruppen in Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363 .

Noch weitere Beispiele für die Kopplungseinheit L sind nachfolgend angegeben:

10 $R_6\text{-NH-}R_7$, $R_6\text{-O-}R_7$, $R_6\text{-S-}R_7$, $R_6\text{-SS-}R_7$, $R_6\text{-CO-NH-}R_7$, $R_6\text{-NH-CO-}R_7$, $R_6\text{-CO-O-}R_7$,
 $R_6\text{-O-CO-}R_7$, $R_6\text{-CO-S-}R_7$, $R_6\text{-S-CO-}R_7$, $R_6\text{-P(O)}_2\text{-}R_7$, $R_6\text{-Si-}R_7$, $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}R_7$,
 $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-A-(CH}_2\text{)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-B-}R_7$,
 $R_6\text{-(CH=CH-)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(A-CH=CH-)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(CH=CH-B-)}_n\text{-}R_7$,
 $R_6\text{-A-CH=CH-(CH}_2\text{)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(-CH=CH-CH}_2\text{)}_n\text{-B-}R_7$, $R_6\text{-(-CH=CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-B-}R_7$,
 $R_6\text{-(C}\equiv\text{C-)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(A-C}\equiv\text{C-)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(C}\equiv\text{C-B-)}_n\text{-}R_7$,
15 $R_6\text{-A-C}\equiv\text{C-(CH}_2\text{)}_n\text{-}R_7$, $R_6\text{-(-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{)}_n\text{-B-}R_7$, $R_6\text{-(-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-B-}R_7$,

20 wobei R_6 - die Nuk-Komponente ist, R_7 - de Polymer ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)₂-, -Si-, -(CH₂)_n-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

25 Die Kopplungseinheit L ist auf einer Seite mit der Nuk-Komponente, auf der anderen mit Polymer kovalent verbunden. Die Art der Kopplung hängt von der Art des Polymers ab. In bevorzugter Form hat das Polymer an seinen Enden reaktive Gruppen, beispielsweise NH₂ (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid, Halogen-Gruppen. Solche Polymere sind käuflich erwerblich (z.B. Fluka). Einige Varianten für die Kopplung von Polymeren an die Kopplungseinheiten sind unter Beispielen 1 bis 33 angegeben.

30 Das wasserlösliche Polymer bildet in einer bevorzugten Ausführungsform den Hauptanteil der Linker-Komponente. Es ist ein Polymer, vorzugsweise hydrophil, bestehend aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren. Beispiele für geeignete Polymere stellen Polyethylen-glycol (PEG), Polyamide (z.B. Polypeptide), Polysaccharide und deren Derivate, Dextran und seine Derivate, Polyphosphate,
35 Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure und ihre Derivate, Poly-Acrylamide in ihre derivate, Poly(Vinylalkohol), Polylactat Säure,

polyglycolic Säure, Poly(epsilon-caprolactone), Poly(beta-hydroxybutyrate), Poly(beta-hydroxyvalerate), Polydioxanone, Poly(ethylene terephthalate), Poly(malic Säure), Poly(tartronic Säure), Poly(ortho ester), Polyanhydride, Polycyanoacrylate, Poly(phosphoester), Polyphosphazene, Hyaluronidate, Polysulfones.

5

Dieses Polymer schließt in einer Ausführungsform verzweigte oder weiteren Ausführungsform nicht verzweigte Polymere ein. Das Polymer kann aus mehreren unterschiedlich langen Abschnitten bestehen, wobei jeder Abschnitt aus gleichen Monomeren besteht und Monomere in unterschiedlichen Abschnitten unterschiedlich sind. Einem Fachmann sollte naheliegend erscheinen, dass für einen makromolekularen Linker meistens nur eine durchschnittliche Masse bestimmt werden kann, so dass die Angaben zu den Molmassen einen Mittelwert darstellen ("Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X). Aus diesem Grund kann für Nuk-Makromoleküle oft keine exakte Massenangabe gemacht werden.

10

15

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung schließt die Linker-Komponente ein lineares, nicht verzweigtes Polymer ein und trägt keine sterisch anspruchsvollen chemischen Strukturen, wie beispielsweise Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe, Liganden. Solche Linker ermöglichen eine geringe sterische Hinderung der enzymatischen Erkennung der Nuk-Komponenten.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Polymer der Linker-Komponente linear, die Linker-Komponente trägt jedoch eine oder mehrere sterisch anspruchsvollen chemischen Strukturen, wie beispielsweise Farbstoffe. Die Einführung der sterisch anspruchsvollen Gruppen erlaubt bei manchen Verfahren eine Kontrolle der enzymatischen Reaktion (Tcherkassov WO 02088382). Weitere Beispiele für sterisch anspruchsvolle Gruppen sind im Abschnitt 1.3.19 angegeben.

25

Sterisch anspruchsvollen Liganden bzw. Strukturen können an unterschiedliche Linker-Abschnitte gekoppelt sein. Die durchschnittliche Zahl der an den Linker gekoppelten sterisch anspruchsvollen Liganden kann variieren und liegt beispielsweise zwischen 1 und 3, 3 und 5, 5 und 20, 20 und 50. Die Kopplung von sterisch anspruchsvollen Gruppen sollte die Tatsache berücksichtigen, dass eine raumfordernde Struktur in der Nähe der Nukleotid-Komponente zur Aufhebung der Substrateigenschaften führen kann, s. Beispiel 25. Sterisch anspruchsvolle Liganden können gleichmäßig oder zufällig über die gesamte Länge des Linkers gekoppelt sein, oder in einem bestimmten Abstand von der Nuk-Komponente am Linker gekoppelt sein. Der Abstand zwischen der

30

35

Nuk-Komponente und dem sterischen Hindernis beträgt beispielsweise 10 bis 15, 15 bis 20, 20 bis 25, 25 bis 30, 30 bis 35, 35 bis 40, 40 bis 45, 45 bis 50, 50 bis 55, 55 bis 60, 60 bis 70, 70 bis 80, 80 bis 90, 90 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 1000, 1000 bis 5000 Kettenatome. Die sterisch anspruchsvolle Gruppe kann als Teil des Linkers
5 oder als Teil des Markers betrachtet werden. Die Betrachtungsweise kann beispielsweise davon abhängen, ob sterisch anspruchsvolle Gruppe gewisse Signaleigenschaften aufweist oder nicht.

1.3.3.2.2 Linker-Länge

10 Die durchschnittliche Linkerlänge beträgt zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 30, 30 bis 40, 40 bis 50, 50 bis 60, 60 bis 70, 70 bis 80, 80 bis 90, 90 bis 100, 100 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10.000, 10000 bis 100000 Atome (gezählt werden Ketten-Atome), somit beträgt die durchschnittliche Linker-Länge zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 30, 30
15 bis 40, 40 bis 50, 50 bis 60, 60 bis 70, 70 bis 80, 80 bis 90, 90 bis 100, 100 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10.000, 10000 bis 100000 Angström (gemessen an einem potenziell maximal ausgestrecktem Molekül).

Falls ein Nuk-Makromolekül mehrere Linker-Komponenten einschließt, können diese
20 Linker-Komponenten untereinander gleiche oder auch unterschiedlich lang sein.

Einige Abschnitte des Linkers können rigide Bereiche enthalten und andere Abschnitte können flexible Bereiche enthalten.

25 1.3.3.2.3 Linker-Kopplung in einem Nuk-Makromolekül

Der Linker ist an einer Seite an die Nuk-Komponente und auf der anderen Seite an die Marker-Komponente gebunden. Dazu kann der Linker an seinen Enden Kopplungseinheiten haben, die diese Funktion erfüllen. Die Verbindung mit der Nuk-Komponenten wurde oben erörtert. Die Verbindung zwischen dem Linker und der
30 Marker-Komponenten erfolgt über Kopplungseinheit T. Bevorzugt sind kurze, unverzweigte Verbindungen, bis max. 20 Atome in der Länge. Die jeweilige Struktur der Kopplungseinheit T hängt von der Kopplungsstelle an der Marker-Komponente und von dem jeweiligen Polymer des Linkers. Die Kopplungseinheit T ist mit dem Polymer kovalent verbunden. Die Art der Kopplung hängt von der Art des Polymers ab. In
35 bevorzugter Form hat das Polymer an seinen Enden reaktive Gruppen, beispielsweise NH₂ (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid, Halogen-Gruppen. Solche Polymere sind kommerziell erhältlich (z.B. Fluka). Einige Beispiele für die Kopplungseinheiten L sind in Beispielen 1 bis 33

angegeben, Weitere Beispiele für die chemische und affine Kopplungen s. in der Literatur: „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996.

5

Der Linker kann auch andere funktionelle Gruppen, bzw. Abschnitte enthalten, beispielsweise eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Gruppen (Fig.9) s. Beispiele 22, 23, 24, 31.

10

Eine spaltbare Verbindung innerhalb des Linkers ermöglicht eine Entfernung eines Teils des Linkers und der Marker-Komponente. Nach der Spaltung verbleibt ein Linker-Rest an der Nuk-Komponente, Beispiele für spaltbare Verbindungen sind im Abschnitt 1.3.3.1.4 angegeben.

15

1.3.3.3 Marker-Komponente

Die Marker-Komponente kann unterschiedliche Strukturen haben. Die Strukturen im einzelnen sind nicht eingeschränkt, solange sie die Substrateigenschaften der Nuk-Komponenten für Enzyme nicht aufheben. Diese Struktur hat vorzugsweise eine signalgebende oder eine signalvermittelnde Funktion. Der Marker kann auch andere Funktionen haben, beispielsweise strukturelle, antitoxische oder affine Funktion (beispielsweise in Arzneimitteln oder Zubereitungen).

20

1.3.3.3.1 Die Zusammensetzung der Marker-Komponente (Marker)

Der Marker schließt in einer Ausführung eine niedermolekulare Marker-Einheit ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker eine makromolekulare Marker-Einheit ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker mehrere niedermolekulare Marker-Einheiten ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker mehrere makromolekulare Marker-Einheiten ein. In einer weiteren Ausführungsform schließt der Marker eine Kombination aus niedermolekularen und makromolekularen Einheiten ein. Die Marker-Einheiten können eine signalgebende oder signalvermittelnde Funktion haben.

25

30

35

Diese Einheiten können Moleküle mit geringer Molekularmasse, z.B. unter 2000 Da, oder auch selbst Makromoleküle sein. Dabei schließt die Zahl der signalgebenden oder signalvermittelnden Einheiten, die zu einer Marker-Komponenten zusammengefaßt sind, folgende Bereiche ein: 1 und 2, 2 und 5, 5 und 20, 20 und 50, 50 und 100, 100 und 500, 500 und 1000, 1000 und 10000, 10000 und 100000.

Falls mehrere Marker-Einheiten in einem Marker zusammengefasst sind, sind diese Einheiten in einer Ausführungsform an ein Gerüst gebunden, die Kern-Komponente des Markers (Fig. 4b,c). Diese Kern-Komponente verbindet die Einheiten untereinander. Die Kern-Komponente kann die Verbindung zu einem oder mehreren Nuk-Linker-Komponenten herstellen (Fig 5). Die Kern-Komponente schließt niedermolekulare oder makromolekulare Verbindungen ein.

1.3.3.3.2 Struktur der signalgebenden oder der signalvermittelnden Einheiten des Markers

Die strukturellen Marker-Einheiten schließen folgende Gruppen ein:

1.3.3.3.2.1 Strukturen mit niedriger Molmasse:

Biotin-Moleküle, Hapten-Moleküle (z.B. Digoxigenin), radioaktive Isotope (z.B. P^{32} , J^{131}), oder deren Verbindungen, seltene Erden, Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe, Fluoreszenz-Quencher (z.B. Dabsyl) (viele dieser Moleküle sind kommerziell erhältlich z.B. von Molecular Probes, Inc., oder Sigma-Aldrich) mit gleichen oder unterschiedlichen spektralen Eigenschaften, Farbstoffe, die untereinander FRET eingehen. Thermochrome, photochrome oder chemolumineszente Substanzen (erhältlich z.B. bei Sigma-Aldrich), Chromogene Substanzen (z.B. als Substrate für Peptidasen beschrieben in „Proteolytic enzymes Tools and Targets“, E. Sterchi, 1999, ISBN 3-540-61233-5).

Auch chemisch reaktive Gruppen, wie beispielsweise Amino-, Carboxy-, Merkapto-, Aldehyd-, Jodacetat-, Acryl-, Dithio-, Thioester-Verbindungen können als signalvermittelnde strukturelle Einheiten dienen (Fig. 6a). Nach dem Einbau können diese reaktiven Gruppen mit signalgebenden Elementen, wie beispielsweise Farbstoffe mit entsprechenden reaktiven Gruppen (beispielsweise NHS-Ester, Merkapto-, Amino-Gruppen) modifiziert werden (Fig. 6b). Allgemeine Grundlagen für die Wahl eines passenden Paares von reaktiven Gruppen sind in „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 dargestellt.

In einer speziellen Ausführungsform erfüllt die Kombination aus einer Nuk-Einheit, einer makromolekularen Linker-Komponente und einem Marker mit niedriger Molmasse bereits die Anforderungen der vorliegenden Erfindung. Solche Verbindungen sind ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung. Sie können sowohl als Zwischenprodukte für die chemische Synthese von Nuk-Makromolekülen mit einem makromolekularen Marker, z.B. dUTP-PEG-Biotin, als auch selbständig in den enzymatischen Reaktionen verwendet werden, wie beispielsweise mit nur einem Farbstoff markierte Nukleotide.

Als Farbstoffe können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auftreten, ihre Wahl ist nicht eingeschränkt, solange sie die enzymatische Reaktion nicht wesentlich beeinflussen. Beispiele für Farbstoffe sind Rhodamine (Rhodamin 110, Tetramethylrhodamin, erhältlich bei Fluka-Sigma), Cyanin-Farbstoffe (Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 von Amersham Bioscience), Coumarine, Bodipy, Fluorescein, Alexa-Farbstoffe: z.B. Alexa 532, Alexa 548, Alexa 555 (Molecular Probes). Viele Farbstoffe sind kommerziell erhältlich, beispielsweise von Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande (im weiteren als Molecular Probes bezeichnet) oder von Sigma-Aldrich-Fluka (Taufkirchen, Deutschland). Beispiele für die Synthese eines Nuk-Makromoleküls mit einem niedermolekularem Marker ist in Beispiel 19, 20, 23, 36, 37, 38 angegeben.

In einer Ausführungsform schließt ein Marker mehrere Marker-Einheiten ein. Dabei können die Marker-Einheiten untereinander gleiche oder verschiedene Eigenschaften haben. Beispielsweise können Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Spektraleigenschaften eingesetzt werden. In einer Ausführungsform werden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt, die FRET-Paare bilden.

1.3.3.3.2.2 Strukturen mit hoher Masse (Makromoleküle)

1.3.3.3.2.2.1 Nanokristalle

Nanokristalle, z.B. Quantum Dots können als Marker-Einheiten auftreten. Dabei können in einer Marker-Komponente Quantum Dots mit gleichen oder unterschiedlichen spektralen Eigenschaften verwendet werden, US Pat. 6.322.901, US Pat. 6.423.551, US Pat. 6.251.303, US Pat. 5.990.479).

1.3.3.3.2.2.2 Nano oder Mikro-Teilchen.

Nano oder Mikro-Teilchen können als Marker-Einheiten auftreten, wobei die größten Ausmaße dieser Teilchen von 1nm bis 2nm, von 2nm bis 5nm, von 5nm bis 10nm, von 10nm bis 20 nm, von 20nm bis 50nm, von 50nm bis 100nm, von 100 nm bis 200nm, von 200nm bis 500nm, von 500nm bis 1000nm, von 1000 nm bis 5000 nm betragen. Das Material der Teilchen können beispielsweise reine Metalle wie Gold, Silber, Aluminium (beispielsweise Teilchen mit surface plasmon resonance), - Protein-Au-Konjugate: J. Anal.Chem. 1998, V. 70, S. 5177, - Nukleinsäure-Au-Konjugaten: J. Am. Chem. Soc. 2001, V. 123, S.5164, J. Am. Chem. Soc. 2000, V. 122, S. 9071 Biochem. Biophys. Res. Commun 2000, V. 274, S. 817, Anal. Chem. 2001, V. 73, S. 4450), - Latex (z.B. Latex-Nanopartikel, Anal. Chem. 2000, V. 72, S. 1979) - Kunststoff (Polystyrene), - paramagnetische Verbindungen / Gemische Zhi ZL et al.

Anal Biochem. 2003 Jul 15;318(2):236-43, Dressman D et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 22;100(15):8817-22,, - Metall-Teilchen, - magnetische Verbindungen / Gemische Jain KK. Expert Rev Mol Diagn. 2003 Mar;3(2):153-61, Patolsky F et al. Angew Chem Int Ed Engl. 2003 May 30;42(21):2372-2376, Zhao X et al. Anal Chem. 2003 Jul 15;75(14):3144-51, Xu H et al. J Biomed Mater Res. 2003 Sep 15;66A(4):870-9, JOSEPHSON Lee et al. US Pat. 2003092029, Kliche KAY-OLIVER et al. WO0119405.

1.3.3.3.2.2.3 Proteinmoleküle,

Proteinmoleküle können als Marker-Einheiten auftreten, wobei sie folgende Gruppen schließen: Enzyme (z.B. Peroxidase, alkalische Phosphatase, Urease, beta-Galaktosidase, Proteinasen), - fluoreszierenden Proteine (z.B. aus GFP-Protein-Familie oder Phycobillproteine (z.B. Phycoerythrin, Phycocyanin), erhältlich z.B. von Molecular Probes Inc.), Antigen-bindende Proteine (z.B. Antikörper, Tetramere, Affibodies (Nord et. Al Nature Biotechnology, V. 15 (S.772-777) oder deren Bestandteile (z.B. Fab-Fragmente), Nukleinsäurebindende Proteine (z.B. Transkriptionsfaktor)

1.3.3.3.2.2.4 Nukleinsäureketten,

Die Nukleinsäureketten einschließlich der Gruppe, Oligonukleotide, modifizierte Oligonukleotide, können als Marker-Einheiten auftreten. Die Länge der Nukleinsäureketten liegt vorzugsweise in folgenden Bereichen von 10 bis 20, von 20 bis 50, von 50 bis 100, von 100 bis 200, von 200 bis 500, von 500 bis 1000, 1000 bis 5.000, von 5.000 bis 10.000, von 10.000 bis 100.000 Nukleotiden. Es können DNA, RNA, PNA-Moleküle verwendet werden. Nukleinsäureketten können zusätzliche Modifikationen tragen, wie beispielsweise freie Aminogruppen, Farbstoffe und andere signalgebende Moleküle, z.B. makromolekulare Stoffe, Enzyme oder Nanokristalle (Fig. 7a,c). Modifizierte Nukleinsäureketten sind kommerziell zugänglich, z.B. MWG-Biotech. Weitere Beispiele für Makromoleküle oder Makromolekülkomplexe, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Marker oder Marker-Einheiten in der Marker-Komponente für die Signalverstärkung eingesetzt werden können, sind in US Pat. 4882269, US Pat. 4687732, WO 8903849, US Pat. 6017707, US Pat. 6627469 beschrieben.

Auch anderen Marker-Einheiten, wie Lektine; Wachstumsfaktoren, Hormone, Rezeptor-Moleküle können eingesetzt werden.

1.3.3.3.3 Die Kern-Komponente der Marker-Komponente

Die Kernkomponente hat die Funktion mehrere strukturelle Elemente der Nuk-Makromoleküle zu binden. Beispielsweise bindet die Kern-Komponente mehrere Marker-Einheiten zusammen. In einer weiteren Ausführungsform können Linker-Komponenten an die Kern-Komponente gebunden werden s. Fig. 5. Der Begriff der Kern-Komponente ist funktionell und dient zur Erläuterung von möglichen Strukturen von Nuk-Makromolekülen. Unterschiedliche chemische Strukturen, die Linker und Marker-Einheiten zusammenhalten, können als Kern-Komponente bezeichnet werden. Im Folgenden sind Beispiele für Bestandteile der Kernkomponente angegeben.

1.3.3.3.3.1 Bestandteile der Kernkomponente

In einer Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einer oder mehreren niedermolekularen Verbindungen. Sie haben die Funktion, die Marker-Einheiten untereinander zu verbinden. Die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und den Marker-Einheiten kann kovalent oder affin sein. Bei kovalenter Bindung können beispielsweise Verbindungen mit allgemeiner Struktur-Formel $(F)_m-R-(H)_n$ als Ausgangsmateriel dienen, wo (F) und (H) - reaktive Gruppen darstellen, und R - eine Verbindungskomponente, wobei Zahl solcher Gruppen und ihre Anordnung stark variieren kann. Viele Beispiele sind dem Fachmann bekannt, z.B. Verbindungen aus der Gruppe Cross-Linker („Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc.). Die Struktur ist nicht eingeschränkt. Sie ist vorzugsweise wasserlöslich. Beispielsweise schließen (F) und (H) unabhängig von einander folgende Gruppen ein: NH₂ (Amino), OH (Hydroxy), SH (Mercapto), COOH (Carboxy), CHO (Aldehyd), Acryl- oder Maleimid. Beispiele für (R) stellen wasserlösliche Polymere wie PEG oder Polypeptid-Ketten oder kurze aliphatische Ketten dar:

In einer weiteren Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einem wasserlöslichen Polymer, dabei kann das Polymer aus gleichen oder unterschiedlichen Monomeren bestehen.

Beispiele für den Kern-Komponente stellen folgende Polymere und deren Derivate dar: Polyamide (z.B. Polypeptide wie Poly(glutamin) oder Poly(Glutamin säure)) und deren Derivate, Poly-Acrylsäure und deren Derivate, natürliche oder synthetische Polysaccharide (z.B. Stärke, Hydroxy-Ethyl-Stärke), Dextran und seine Derivate (z.B. Aminodextran, Carboxy-Dextran), Dextrin, Poly-Acrylamide und deren Derivate (z.B. N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamid), Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäuren, Proteine. Diese Polymere können linear, globulär, z.B. Streptavidin oder Avidin, oder verzweigt sein, z.B. Dendrimere (Fig. 8a). Auch vernetzte lösliche

Polymere, wie beispielsweise vernetzte Poly-Acrylamide (Crosslinker Bisacrylamid in Kombination mit Poly-Acrylamid), eingesetzt werden.

Da sowohl die Linker-Komponente als auch die Marker-Komponente wasserlösliche Polymere enthalten können, kann in einer Ausführungsform ein solches Polymer sowohl als Linker als auch als Kern-Komponente dienen. In diesem Fall kann ein Abschnitt eines solchen Polymers als Linker, ein anderer Abschnitt als Kern-Komponente betrachtet werden.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden lineare oder wenig verzweigte Polymere als Kernkomponenten eingesetzt, beispielsweise Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure, Polysaccharide, Dextran, Poly-Acrylamide, Poly-Vinylalkohole. Das Polymer kann aus einheitlichen oder unterschiedlichen Monomeren bestehen. Insbesondere in dieser Ausführungsform kann die Linker-Komponente weniger als 50 Kettenatome aufweisen. So können auch Linker-Längen von ca. 5 bis 10, 10 bis 20 oder 20 bis 50 Kettenatome ausreichend sein, um die Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle für Enzyme zu bewahren. Eine solche Kern-Komponente des Markers erfüllt die Funktion der Linker-Komponente: sie schafft räumlichen Abstand zwischen sterisch anspruchsvollen Marker-Einheiten und aktiven Zentren der jeweiligen Enzyme.

Die wasserlöslichen Polymere haben vorzugsweise eine durchschnittliche Ketten-Länge von 20 bis 1.000.000 Kettenatomen. Beispielsweise liegt die durchschnittliche Kettenlänge zwischen 20 und 100, 100 und 500, 500 und 5000, 5000 und 100000, 100000 und 1000000 Kettenatome.

In einer Ausführungsform liegt das Polymer in wässriger Phase bei pH zwischen 4 und 10 vorwiegend in einer neutralen Form vor (z.B. Dextran oder Polyacrylamid). In einer anderen Ausführungsform liegt das Polymer in einer wässrigen Phase bei pH zwischen 4 und 10 in einer geladenen Form vor. Es kann sowohl positive (z.B. Polylysin) oder negative Ladungen (z.B. Polyacrylsäure) tragen.

Die Kopplung von Marker-Einheiten an ein wasserlösliches Polymer hängt von der Art des Polymers ab. Die für die Kopplung notwendigen reaktiven Gruppen können bereits im Polymer vorhanden sein (z.B. Polylysin oder Polyacrylsäure) oder in einem getrennten Schritt in das Polymer eingeführt werden. Beispielsweise bei Dextran sind viele Varianten der Einführung von reaktiven Gruppen und chemischen Kopplungen bekannt (Molteni L. Methods in Enzymology 1985, v.112, 285, Rogovin A.Z. et al. J.Macromol Sci. 1972, A6, 569, Axen R. et al. Nature 1967, v. 214, 1302, Bethell G.S.

et al. J. Biol.Chem. 1979, v.254, 2572, Lahm O. et al. Carbohydrate Res. 1977, v. 58, 249, WO 93/01498, WO 98/22620, WO 00/07019).

Die Kern-Komponente hat vorzugsweise mehrere Kopplungsstellen, an die weitere
5 Elemente gebunden werden können, z.B. strukturelle Marker-Einheiten oder Nuk-
Linker-Komponente.

Beispielsweise Poly-Lysin-Moleküle haben multiple freie Aminogruppen, an die
mehrere Farbstoffmoleküle, Biotinmoleküle, Haptenmoleküle oder Nukleinsäureketten
10 gekoppelt werden können. Poly-Lysine haben unterschiedliche Molmasse, z.B. 1000-
2000, 2000-10000, 10000-50000 Da können käuflich erworben werden.

Als weiteres Beispiel für die Kernkomponente dienen Nukleinsäurenstränge, wobei die
Nukleinsäureketten eine Länge von 10 bis 20, von 20 bis 50, von 50 bis 100, von 100
15 bis 200, von 200 bis 500, von 500 bis 1000, 1000 bis 5000, von 5000 bis 10000
Nukleotiden haben. Diese Nukleinsäuren dienen als Bindungspartner für
sequenzkomplementäre Markereinheiten (Fig. 7b).

In einer weiteren Ausführungsform besteht die Kern-Komponente aus einem
20 Dendrimer, z.B. Polypropylenimine, Polyaminoamine. Beispiele für andere Dendrimere
sind bekannt: Cientifica "Dendrimers", 2003, Technology white papers Nr. 6, Klajnert
et al. Acta Biochimica Polonica, 2001, v. 48, S. 199, Manduchi et al. Physiol.
Genomics 2002, V.10, S.169, Sharma et al. Electrophoresis. 2003, V. 24, S. 2733,
Morgan et al. Curr Opin Drug Discov Devel. 2002 Nov;5(6):966-73, Benders et al.
25 Nucleic Acids Res. 2002 Jan 15;30(2):E10, Nilsen et al. J Theor Biol. 1997 Jul
21;187(2):273-84. Viele Dendrimere sind kommerziell erwerblich (Genisphere,
www.genisphere.com, Chimera Biotech GmbH).

Weitere Kombinationen für die Kern-Komponente aus den oben dargestellten
30 Bestandteilen sind einem Fachmann naheliegend.

1.3.3.3.2 Kopplung der Marker-Einheiten

Marker-Einheiten können an die Kern-Komponente oder an die Linker-Komponente
durch eine kovalente Bindung, beispielsweise über einen Cross-linker (Chemistry of
35 protein conjugation and cross-linking, S. Wang, 1993, ISBN 0-8493-5886-8,
"Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam,
1996, ISBN 0-333-58375-2), oder über eine affine Kopplung erfolgen, beispielsweise
Biotin-Streptavidin-Verbindung oder Hybridisierung von Nukleinsäuresträngen, oder

Antigen-Antikörper-Wechselwirkung ("Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2).

5 Die Kopplung von Marker-Einheiten an die Kern-Komponente erfolgt in einer Ausführungsform bereits während der Synthese der Nuk-Makromoleküle.

10 In einer anderen Ausführungsform erfolgt zunächst die chemische Synthese von Nuk-Makromoleküle, bei denen die Markerkomponente nur aus der Kern-Komponente besteht. Die Kopplung von Marker-Einheiten an die Kern-Komponente erfolgt erst nach dem Einbau von Nuk-Makromoleküle in die Nukleinsäurekette. Durch eine große Zahl der potenziellen Bindungsstellen am Kernteil ist die Wahrscheinlichkeit der Bindung der Marker-Einheiten an die Kern-Komponente und somit an die eingebaute Nuk-Komponente wesentlich größer im Vergleich zu konventionellen Nukleotid-Strukturen. Die Kopplungschemie im einzelnen hängt von der Struktur der Marker-Einheiten und
15 der Struktur der Kern-Komponente ab.

Kovalente Kopplung: Die Verbindung zwischen den Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein (Beispiel 33), z.B. bei Temperaturen bis zu 100°C, für pH-Bereiche zwischen 3 und 12, und/oder
20 resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

Beispiele für die Kopplung von Nukleinsäuren an Dendrimere (entspricht einer Kopplung von Marker-Einheiten an eine Kernkomponente) sind z.B. in Shchepinov et al. Nucleic Acids Res. 1999 Aug 1;27(15):3035-41, Goh et al. Chem Commun (Camb). 2002 Dec 21;(24):2954 dargestellt.
25

1.3.3.3.3 Kopplung zwischen Linker und Marker

30 Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und dem Marker hängt von der jeweiligen Struktur der Marker-Einheiten bzw. der Struktur der Kern-Komponente ab. In einer Ausführungsform ist die Linker-Komponente direkt an die signalgebende oder signalvermittelnde Marker-Einheit gebunden, Fig. 4a . Dabei kann der Marker aus nur einer oder mehreren Marker-Einheiten bestehen.

35 In einer weiteren Ausführungsform sind ein oder mehrere Linker-Komponenten an die Kern-Komponente des Markers gebunden, Fig. 5d.

Die Bindung zwischen der Linker-Komponente und dem Marker kann sowohl kovalent als auch affine erfolgen. Viele Beispiele sind dem Fachmann bekannt, s. z.B. "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam,

1996, ISBN 0-333-58375-2. „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc.).

Kovalente Kopplung: Die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und dem Marker kann in einer Ausführungsform widerstandsfähig sein, z.B. bei Temperaturen bis zu 130°C, für pH-Bereiche zwischen 1 und 14, und/oder resistent gegen hydrolytische Enzyme (z.B. Proteasen, Esterasen) sein. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und dem Linker unter milden Bedingungen spaltbar.

Die für die Markierung von Nukleotiden erfindungsgemäß eingesetzten Makromolekulare Verbindungen schließen in einigen Ausführungsformen wasserlösliche Polymere ein (s.o.). Die Linker der Nukmakromoleküle schließen ebenfalls wasserlösliche Polymere ein (s.o.). Es ist für den Fachmann erkennbar, dass die Zuordnung einzelner Polymere zum Linker oder zum Marker einen beschreibenden Charakter hat.

1.3.3.3.4 Das Verhältnis der Nuk- Komponenten in einem Nuk-Makromolekül

Ein Nuk-Makromolekül kann durchschnittlich 1 bis 2, 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 30, 30 bis 100, 100 bis 1000 Nuk-Komponenten einschließen.

In einer Ausführungsform haben alle Nuk-Makromoleküle eine gleiche Anzahl an Nuk-Komponenten pro ein Nuk-Makromolekül. Beispielsweise können pro ein Streptavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, bei sättigender Konzentration von Nuk-Linker-Komponenten, eine einheitliche Population an Nuk-Makromolekülen entsteht.

In einer anderen Ausführungsform haben die Nuk-Makromoleküle einer Population eine definierte durchschnittliche Anzahl von Nuk-Komponenten pro Nuk-Makromolekül, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Nuk-Komponenten statt. Die Verteilungsangaben von Nuk-Komponenten pro Nuk-Makromolekül stellen in diesem Fall einen Mittelwert dar.

1.3.3.3.5 Das Verhältnis von Marker-Einheiten in einem Nuk-Makromolekül

Die Zahl der Marker-Einheiten in einem Nuk-Makromolekül schließt folgende Bereiche ein: 1 und 2, 2 und 5, 5 und 20, 20 und 50, 50 und 100, 100 und 500, 500 und 1000, 1000 und 10000, 10000 und 100000.

In einer Ausführungsform der Erfindung haben Nuk-Makromoleküle eine feste Anzahl von signalgebenden Einheiten pro Marker.

In einer anderen Ausführungsform kann die Verteilung von Marker-Einheiten in einer Nuk-Makromolekül-Population schwanken und muß nicht notwendigerweise einen
5 konstanten Wert für jedes einzelne Nuk-Makromolekül darstellen.

In einer Ausführungsform haben alle Nuk-Makromoleküle eine gleiche Anzahl der Marker-Einheiten pro ein Nuk-Makromolekül. Beispielsweise können pro ein Streptavidin-Molekül maximal 4 Biotin-Moleküle gebunden werden, Avidin-Biotin-
10 Technology, Methods in Enzymology v.184, 1990..

In einer anderen Ausführungsform haben die Nuk-Makromoleküle einer Population eine definierte durchschnittliche Zahl der Marker-Einheiten pro Nuk-Makromolekül, in der Population selbst findet allerdings eine Verteilung der tatsächlichen Besetzung der
15 Nuk-Makromoleküle mit Marker-Einheiten statt. Bei sättigenden Konzentrationen bei der Synthese von Marker-Komponenten findet eine zunehmend einheitlichere Besetzung der Nuk-Makromoleküle mit Marker-Einheiten statt.

So spielt beispielsweise in Bereichen, wo es um den qualitativen Nachweis geht, die
20 exakte Zahl der Marker-Einheiten pro Nuk-Makromolekül eine untergeordnete Rolle. In solchen Fällen ist das Vorhandensein eines stabilen Signals an sich von Bedeutung.

Es sollte einem Fachmann naheliegend erscheinen, dass die angeführten Marker-Komponenten eine beträchtlich größere Molekül-Größe und -Masse haben, als die
25 jeweilige Nuk-Komponente selbst. Weiterhin sollten andere Beispiele für makromolekulare Marker-Komponenten einem Fachmann naheliegend erscheinen.

1.3.3.3.6 Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle

Die Nuk-Komponente gebunden an ein Nuk-Makromolekül kann als Substrat für
30 unterschiedliche Enzyme dienen. Beispielsweise dient die Nuk-Komponente, in dieser Ausführungsform als Nukleosid-Triphosphat, als Substrat für eine Polymerase, so dass die Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang durch eine Polymerase eingebaut werden kann und somit das gesamte Nuk-Makromolekül an den Strang kovalent gekoppelt wird.

35 Weitere Beispiele für Enzyme stellen Kinasen, Phosphorylasen, Transferasen dar.

Als Monomer-Teil einer Nukleinsäurekette können Nuk-Makromoleküle ebenfalls als Substrate für Enzyme auftreten, beispielsweise für die 3'- oder 5'-Exonuklease oder

Endonukleasen ("Molecular cloning" 1989, Ed. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory), oder für die entsprechenden Teilaktivitäten von Polymerasen, wie beispielsweise in für real-time-PCR beschrieben (S. Meuer "Rapid cycle real time PCR", Springer 2004, ISBN 3-540-66736-9, T. Weissensteiner "PCR-Technology: current innovations" CRC Press 2004 ISBN 0-8493-1184-5).

Die Substrateigenschaften der Nuk-Komponente(n) bestimmt/bestimmen die Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle. So kann die Nuk-Komponente als ein Terminator dienen, so dass nur ein einziges Nuk-Makromolekül eingebaut werden kann. In einer anderen Ausführungsform dient die Nuk-Komponente als ein reversibler Terminator, der die Durchführung einer schrittweise kontrollierten Verlängerungsreaktion erlaubt, wie z.B. in Ju et al. US Pat. 6664079, Tcherkassov WO 02088382 dargestellt ist.

Als Monomer-Teil einer Nukleinsäurekette können sie alleine für die enzymatischen Eigenschaften bestimmend sein, wie z.B. für Exonuklease-Aktivität. In einer anderen Ausführungsform bestimmen die enzymatischen Eigenschaften nicht nur die Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle, sondern auch die benachbarten Nukleotide, wie im Falle der Endonukleasen.

1.3.3.3.7 Funktion der Marker

Die makromolekulare Marker-Komponente kann in einer Ausführungsform eine signalgebende Funktion haben. In einer anderen Ausführungsform hat sie eine signalvermittelnde Funktion. In einer weiteren Ausführungsform hat sie eine katalytische Funktion. In einer weiteren Ausführungsform hat sie eine affine Funktion. In einer weiteren Ausführungsform hat der Marker mehr als nur eine Funktion, sondern z.B. vereinigt sowohl signalgebende als auch eine signalvermittelnde Funktion. Weitere Kombinationen sind nahe liegend.

Bei der signalgebenden Funktion enthält die Marker-Komponente Bestandteile, die bereits während der chemischen Synthese an Nuk-Makromoleküle gebunden werden, s. Beispiel 33.

Bei der signalvermittelnden Funktion trägt die Marker-Komponente Bestandteile, die erst durch eine Reaktion mit signalgebenden Molekülen ihre Signaleigenschaften entfalten, s. Beispiel 32.

Beispielsweise können mehrere Biotin-Moleküle, z.B. 100 Biotin-Moleküle, den Marker-Teil bilden. Nach dem Einbau der Nuk-Makromoleküle erfolgt eine Nachweisreaktion

mit modifizierten Streptavidin-Molekülen. In einem anderen Beispiel haben die Nukleinsäureketten die signalvermittelnde Funktion. Nach dem Einbau von Nuk-Makromoleküle, erfolgt eine Hybridisierung von einheitlichen Oligonukleotiden mit detektierbaren Einheiten, z.B. Fluoreszenzfarbstoffen (MWG-Biotech) an die Marker-Komponente. In einem weiteren Beispiel haben Amino- oder Merkapto-Gruppen, beispielsweise 50 Aminogruppen pro Marker, die signalvermittelnde Funktion. Nach dem Einbau der Nuk-Makromoleküle in die Nukleinsäurekette erfolgt eine chemische Modifikation mit reaktiven Komponenten, z.B. mit Farbstoffen, wie beispielsweise für eingebaute Allyl-Amino-dUTP beschrieben, Diehl et al. Nucleic Acid Research, 2002, V. 30, Nr. 16 e79.

In einer anderen Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine katalytische Funktion (in Form eines Enzyms oder Ribozyms). Dabei können unterschiedliche Enzyme verwendet werden, z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase. Dank der Kopplung an die Nuk-Komponente kann das jeweilige Enzym durch den Einbau von Nuk-Makromolekülen an den Nukleinsäurestrang kovalent gebunden werden.

In einer weiteren Ausführungsform hat die makromolekulare Marker-Komponente eine Affinitätsfunktionalität zu einem anderen Molekül. Beispiele für solche Marker bilden Streptavidin-Moleküle, Antikörper oder Nukleinsäureketten, Beispiel 30 oder 32.

1.3.4. Niedermolekularer Marker - zum Stand der Technik gehörende Markierung von Nukleotiden beispielsweise mit ein oder zwei Biotin-Molekülen, ein oder zwei Farbstoff-Molekülen, ein oder zwei Hapten-Molekülen (z.B. Digoxigenin).

1.3.5. Konventionell modifiziertes Nukleotid - ein Nukleotid mit einem Linker (durchschnittliche Länge zwischen 5 und 30 Atomen) und einem Marker. Üblicherweise trägt ein konventionell modifiziertes Nukleotid einen niedermolekularen Marker, z.B. ein Farbstoff- oder ein Biotinmolekül.

1.3.6. Enzyme (Polymerasen)

In einer Ausführungsform können die Nuk-Makromoleküle als Substrate für Enzyme eingesetzt werden. Polymerasen stellen in Anwendungen oft eingesetzte Enzyme, die Nukleotide als Substrate verwenden. Sie werden im weiteren beispielhaft und stellvertretend für andere Nukleotid-umsetzende Enzyme betrachtet. Eine der zentralen Fähigkeit der Polymerasen besteht in kovalenten Kopplung von Nukleotid-Monomeren zu einem Polymer. Dabei kann die Synthese sowohl matrizen-abhängig (wie z.B. DNA-oder

RNA-Synthese mit DNA- oder RNA-abhängigen Polymerasen) als auch matrizen-unabhängig, z.B. durch Terminale Transferasen ("J Sambrook "Molecular Cloning" 3. Ed. CSHL Press 2001).

- 5 Falls RNA als Substrat (z.B. mRNA) in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt wird, können handelsübliche RNA-abhängige DNA-Polymerasen eingesetzt werden, z.B. AMV-Reverse Transcriptase (Sigma), M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma), HIV-Reverse Transcriptase ohne RNase-Aktivität. Für bestimmte Anwendungen, können Reverse Transcriptasen von RNase-Aktivität weitgehend frei sein ("Molecular cloning" 1989, Ed. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory), z.B. bei mRNA-Markierung für Hybridisierungsexperimente.

- Falls DNA als Substrat (z.B. cDNA) verwendet wird, eignen sich als Polymerasen prinzipiell alle DNA-abhängigen DNA-Polymerasen mit oder ohne 3'-5' Exonuklease-Aktivität (DNA-Replikation" 1992 Ed. A.Kornberg, Freeman and company NY), z.B. modifizierte T7-Polymerase vom Typ "Sequenase Version 2" (Amersham Pharmacia Biotech), Klenow Fragment der DNA-Polymerase I mit oder ohne 3'-5' Exonukleaseaktivität (Amersham Pharmacia Biotech), Polymerase Beta verschiedenen Ursprungs (Animal Cell DNA Polymerases" 1983, Fry M., CRC Press Inc., kommerziell erhältlich bei Chimerx) thermostabile Polymerasen wie beispielsweise Taq-Polymerase (GibcoBRL), proHA-DNA-Polymerase (Eurogentec), Vent, Vent exo minus, Pfu, Thermosequenase, Pwo-Polymerase usw. (Promega).

- Auch DNA-abhängige RNA-Polymerasen können verwendet werden, z.B. E.coli RNA-Polymerase, T7-RNA-Polymerase, SP6 RNA Polymerase.

Die Polymerasen können eine 3'- oder eine 5'-Exonuklease-Aktivität aufweisen und in bestimmten Anwendungen eingesetzt werden (z.B. bei real-time PCR).

- In der Anmeldung werden DNA-abhängige DNA-Polymerasen als Beispiele für Polymerasen betrachtet.

- 1.3.7. Spaltbare Verbindung** - Eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung. Diese Verbindung kann einen Abschnitt im Linker darstellen und kann an einer oder an mehreren Stellen spaltbar sein. Es kann sich um eine chemisch spaltbare Verbindung, wie z.B. eine Disulfid-, eine Ester-, eine Acetal-, eine Thioesterverbindung (Short WO 9949082, Tcherkassov WO 02088382) handeln. Es kann auch eine photochemisch spaltbare Verbindung, wie in (Rothschild WO 9531429) dargestellt sein. Es kann auch eine enzymatisch spaltbare Verbindung (beispielsweise

eine Peptid- oder Polypeptide-Bindung, Odedra WO 0192284), spaltbar durch Peptidasen, eine Poly- oder Oligosaccharid-Bindung, spaltbar durch Disaccharidasen) sein, wobei die Spaltung durch ein spezifisches Enzym zwischen bestimmten Monomeren der spaltbaren Stellen stattfinden kann.

- 5 Mehrere Beispiele für spaltbare Verbindungen sind bekannt. Die Kopplung einer solchen Verbindung ist beispielsweise beschrieben in (Tcherkassov 02088382, Metzker et al. Nucleic Acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, , Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642.). Eine Spaltbare Verbindung kann ein Teil des Linkers sein oder die Kopplungsstelle des
- 10 Linkers an das Nukleotid bilden, oder die Verbindung zwischen der Linker-Komponente und der Makrer-Komponente, oder die Verbindung zwischen den Marker-Einheiten und der Kern-Komponente.

- 15 **1.3.8 DNA** - Deoxyribonukleinsäure verschiedenen Ursprungs und unterschiedlicher Länge (z.B. Oligonukleotide, Polynukleotide, Plasmide, genomische DNA, cDNA, ssDNA, dsDNA)

1.3.9 RNA - Ribonukleinsäure

- 20 **1.3.10 dNTP** - 2'-deoxy-Nucleosid-Triphosphate, Substrate für DNA-Polymerasen und Reverse-Transkriptasen, z.B. dATP, dGTP, dUTP, dTTP, dCTP.

1.3.11 NTP - Ribonukleosid-Triphosphate, Substrate für RNA-Polymerasen, UTP, CTP, ATP, GTP.

- 25 **1.3.12** Abkürzung "NT" wird auch bei der Längenangabe einer Nukleinsäuresequenz verwendet, z.B. 1.000 NT. In diesem Fall steht "NT" für Nukleosid-Monophosphate.

- 30 Im Text wird bei Abkürzungen die Mehrzahl durch Verwendung des Suffixes "s" gebildet, "NT" steht zum Beispiel für "Nukleotid", "NTs" steht für mehrere Nukleotide.

1.3.13 NSK - Nukleinsäurekette. DNA oder RNA

- 35 **1.3.14 Gesamtsequenz** - Summe aller Sequenzen im Ansatz, sie kann ursprünglich aus einer oder mehreren NSKs bestehen. Dabei kann die Gesamtsequenz Teile oder Äquivalente einer anderen Sequenz oder von Sequenz-Populationen darstellen (z.B. mRNA, cDNA, Plasmid-DNA mit Insert, BAC, YAC) und aus einer oder unterschiedlichen Spezies stammen.

1.3.15 NSKF - Nukleinsäurekettenfragment (DNA oder RNA), das einem Teil der Gesamtsequenz entspricht, NSKFs - Nukleinsäurekettenfragmente. Die Summe der NSKFs bildet ein Äquivalent zur Gesamtsequenz. Die NSKFs können beispielsweise Fragmente von DNA- oder RNA-Gesamtsequenz sein, die nach einem Fragmentierungsschritt entstehen.

1.3.16 Primerbindungstelle (PBS) - Teil der Sequenz in der NSK oder NSKF, an den der Primer bindet.

1.3.17 Referenzsequenz - eine bereits bekannte Sequenz, zu der die Abweichungen in der zu untersuchenden Sequenz bzw. in den zu untersuchenden Sequenzen (z.B. Gesamtsequenz) ermittelt werden. Als Referenzsequenzen können in Datenbanken zugängliche Sequenzen verwendet werden, wie z.B. aus der NCBI-Datenbank.

1.3.18 Tm - Schmelztemperatur

1.3.19 Sterisches Hindernis, sterisch anspruchsvolle Gruppe oder Ligand

Sterisch anspruchsvolle Gruppe oder Ligand, die durch ihre chemische Struktur die Eigenschaften der mit dieser Gruppe gekoppelten Nukleotide so verändert, dass diese durch eine Polymerase in einer Extensionsreaktion nicht nacheinander eingebaut werden können. Eine oder mehrere an die Base gekoppelte sterisch anspruchsvolle Gruppen können zur Aufhebung der Synthese oder zu Behinderung der weiteren Synthese führen. Viele in der modernen Forschung eingesetzten Marker stellen ein sterisches Hindernis dar für die Enzyme dar. Biotin, Digoxigenin und Fluoreszenzfarbstoffe wie Fluoreszein, Tetramethylrhodamine, Cy3-Farbstoff stellen Beispiele einer solchen sterisch anspruchsvollen Gruppe dar (Zhu et al. Cytometry 1997, v.28, S.206, Zhu et al. NAR 1994, v.22, S.3418, Gebeyehu et al., NAR 1987, v.15, S.4513, Wiemann et al. Analytical Biochemistry 1996, v.234, S.166, Heer et al. BioTechniques 1994 v.16 S.54). Weitere sterisch anspruchsvollen Gruppen können beispielsweise lineare oder verzweigte Polymere mit einer kompakten drei-dimensionalen Struktur, wie z.B. Proteine oder Dendrimere darstellen.

1.3.20 PNA - Peptide Nucleic Acid

2. Detaillierte Beschreibung:

Die Erfindung beschreibt eine neue Klasse an modifizierten Nukleotiden.

1. Aspekt der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen mit der Struktur:

(Nuk-Linker)_n-Marker

wobei:

Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist (Nuk-Komponente)

Linker - eine Linker-Komponente, die eine Nuk-Komponente und eine makromolekulare Marker-Komponente verbindet

Marker - eine makromolekulare Marker-Komponente ist

n - eine Zahl von 1 bis 1000 ist

Ein weiterer Aspekt 2 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3A):

Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen, wobei L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente darstellt (Kopplungseinheit L) und X die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an der Base ist

R₁ - ist H

R₂ - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH₂, SH oder geschützte OH-Gruppe

R₃ - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, PO₃, SH, N₃, NH₂, O-R₃₋₁, P(O)_m-R₃₋₁ (m ist 1 oder 2 ist), NH-R₃₋₁, S-R₃₋₁, Si-R₃₋₁ wobei R₃₋₁ eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist, oder eine der folgenden Modifikationen einschließt: -CO-Y, -CH₂-O-Y, -CH₂-S-Y, -CH₂-N₃, -CO-O-Y, -CO-S-Y, -CO-NH-Y, -CH₂-CH=CH₂, wobei Y ein Alkyl ist, beispielsweise (CH₂)_n-CH₃ wobei n zwischen 0 und 4 liegt, oder ein substituiertes Alkyl ist, beispielsweise mit Halogen, Hydroxy, Amino, Carboxy-Gruppen).

R₄ - ist H oder OH

R₅ - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

Ein weiterer Aspekt 3 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3B):

Wobei:

5 Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

R_1 - ist H

10 R_2 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH_2 , SH oder geschützte OH-Gruppe

15 R_3 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R_{3-2} -L, $P(O)_m$ - R_{3-2} -L, wobei m 1 oder 2 ist, NH - R_{3-2} -L, S - R_{3-2} -L, Si - R_{3-2} -L oder, wobei R_{3-2} die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L) ist.

R_4 - ist H oder OH

20 R_5 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

Ein weiterer Aspekt 4 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt (Fig. 3B):

25

Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

30

R_1 - ist H

R_2 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH_2 , SH oder geschützte OH-Gruppe

35

R_3 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO_3 , SH, NH_2 , O- R_{3-1} , $P(O)_m$ - R_{3-1} , NH - R_{3-1} , S - R_{3-1} , Si - R_{3-1} wobei R_{3-1} eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist und m 1 oder 2 ist.

R_4 - ist H oder OH

R_5 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R_{5-1} -L, oder $P(O)_3$ - R_{5-1} -L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), oder $P(O)_3$ - $P(O)_3$ - R_{5-1} -L (modifizierte Diphosphat-Gruppe)
 oder $P(O)_3$ - $P(O)_3$ - $P(O)_3$ - R_{5-1} -L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei R_{5-1} die Kopplungsstelle der Kopplungseinheit L an das Nukleotid ist und Kopplungseinheit L die Verbindung zwischen der Nuk-Komponente und der Linker-Komponente ist.

Ein weiterer Aspekt 5 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 4, wobei Kopplungseinheit L folgende strukturelle Elemente einschließt:

R_6 -NH- R_7 , R_6 -O- R_7 , R_6 -S- R_7 , R_6 -SS- R_7 , R_6 -CO-NH- R_7 , R_6 -NH-CO- R_7 , R_6 -CO-O- R_7 ,
 R_6 -O-CO- R_7 , R_6 -CO-S- R_7 , R_6 -S-CO- R_7 , R_6 -P(O)₂- R_7 , R_6 -Si- R_7 , R_6 -(CH₂)_n- R_7 ,
 R_6 -(CH₂)_n- R_7 , R_6 -A-(CH₂)_n- R_7 , R_6 -(CH₂)_n-B- R_7 ,
 R_6 -(CH=CH-)_n- R_7 , R_6 -(A-CH=CH-)_n- R_7 , R_6 -(CH=CH-B-)_n- R_7 , R_6 -(CH=CH-CH₂-B-)_n- R_7 ,
 R_6 -A-CH=CH-(CH₂)_n- R_7 , R_6 -(-CH=CH-CH₂)_n-B- R_7 ,
 R_6 -(C≡C-)_n- R_7 , R_6 -(A-C≡C-)_n- R_7 , R_6 -(A-C≡C-CH₂)_n- R_7 , R_6 -(C≡C-B-)_n- R_7 ,
 R_6 -(C≡C-CH₂-B-)_n- R_7 , R_6 -A-C≡C-(CH₂)_n- R_7 , R_6 -(-C≡C-CH₂)_n-B- R_7 ,
 R_6 -(-C≡C-CH₂-CH₂)_n-B- R_7

wobei R_6 - die Nuk-Komponente ist, R_7 - der Linkerrest ist und A und B unabhängig folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)₂-, -Si-, -(CH₂)_n-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

Ein weiterer Aspekt 6 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 5, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

Ein weiterer Aspekt 7 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 6, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(x-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

Ein weiterer Aspekt 8 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 7, wobei die Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 bis 100000, 100000 bis 500000 Atomen hat.

Ein weiterer Aspekt 9 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 8, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

Ein weiterer Aspekt 10 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

Ein weiterer Aspekt 11 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus mehreren strukturellen Marker-Einheiten gebunden an eine Kern-Komponente besteht

Ein weiterer Aspekt 12 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:

Biotin, Hapten, radioaktives Isotop, seltenes Erdenelement, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.

Ein weiterer Aspekt 13 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:

Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.

Ein weiterer Aspekt 14 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:

Enzyme oder deren Konjugate oder Modifikationen,
Antikörper oder deren Konjugate oder Modifikationen,
Streptavidin oder seine Konjugate oder Modifikationen,
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen

Ein weiterer Aspekt 15 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekt 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotiden oder deren Äquivalente liegt.

Ein weiterer Aspekt 16 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 11 bis 15, wobei die Kern-Komponente der Marker-Komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer unabhängig ausgewählt aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Poly-Acrylsäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Polysaccharide, Dextran und seine Derivate, Nukleinsäureketten und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei einzelne Polymere linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können

Ein weiterer Aspekt 17 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, 11 bis 16, wobei die Verbindung zwischen mehreren strukturellen Marker-Einheiten und der Kern-Komponente kovalent oder affine erfolgt.

Ein weiterer Aspekt 18 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 10, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt.

Ein weiterer Aspekt 19 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 9, 11 bis 17, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

Ein weiterer Aspekt 20 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Atome beträgt.

Ein weiterer Aspekt 21 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 20, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Atome beträgt und die Linker-Komponente eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

Ein weiterer Aspekt 22 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 21, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

Ein weiterer Aspekt 23 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen eigenen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt sind, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Atome beträgt.

Ein weiterer Aspekt 24 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, 23, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen eigenen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Atome beträgt und der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

Ein weiterer Aspekt 25 der Erfindung betrifft makromolekulare Verbindungen nach Aspekten 1 bis 19, 23, 24, wobei mehrere Nuk- Komponenten jeweils über einen eigenen Linker an einer Marker- Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker- Komponente zwischen 2 und 5, 5 und 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Atome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

Ein weiterer Aspekt 26 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Aspekten 1 bis 25 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

Ein weiterer Aspekt 27 der Erfindung betrifft Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Aspekt 26, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

Ein weiterer Aspekt 28 der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifizierung von Nukleinsäureketten, wobei für die Kopplung Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 verwendet werden

Ein weiterer Aspekt 29 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Aspekten 1 bis 25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,

- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten,

Ein weiterer Aspekt 30 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Aspekten 1-25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten
- mindestens eine weitere Art von Nukleosidtriphosphaten

Ein weiterer Aspekt 31 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 29, 30, wobei die Enzymart unabhängig eine der folgenden Gruppen einschließt: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Terminale Transferase,

Ein weiterer Aspekt 32 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 30, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: Ribo-Nukleosidtriphosphaten (ATP, GTP, UTP, CTP), von 2'-Deoxyribonukleosid-Triphosphaten (dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP), von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddUTP, ddCTP, ddTTP).

Ein weiterer Aspekt 33 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 32, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten konventionell modifizierte Nukleotide mit einer Markierung sind, wobei diese Markierung unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Biotin, ein Hapten, ein radioaktives Element.

Ein weiterer Aspekt 34 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 33, wobei mindestens zwei unterschiedliche Populationen an Nukleinsäureketten präsent sind

Ein weiterer Aspekt 35 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 34, wobei mindestens eine der Populationen der Nukleinsäureketten eine Primer-Funktion hat und mindestens eine Population der Nukleinsäureketten eine Matrizen-Funktion.

Ein weiterer Aspekt 36 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 28, wobei die Modifizierung durch eine chemische Kopplung erfolgt, wobei die Kopplung der Nuk-Makromoleküle an Nukleinsäureketten durch Phosphoroamidit-Kopplung erfolgt.

Ein weiterer Aspekt 37 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die die Kopplung nur einer einzigen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang zulassen und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt 38 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 37, wobei die weitere Kopplung reversibel verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt 39 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 37, wobei die weitere Kopplung irreversibel verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt 40 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die eine Kopplung mehrerer Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäurestrang zulassen

Ein weiterer Aspekt 41 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28-40, wobei die an der Reaktion teilnehmenden Nukleinsäureketten an eine feste Phase gekoppelt sind und adressierbare Positionen haben.

Ein weiterer Aspekt 42 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 41, wobei die Nukleinsäureketten eine einheitliche Population darstellen

Ein weiterer Aspekt 43 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 41, wobei die Nukleinsäureketten zwei oder mehrere unterschiedliche Populationen darstellen und jede der Populationen eine adressierbare Position auf der festen Phase hat

Ein weiterer Aspekt 44 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 45 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 46 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen jeweils unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 47 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

Ein weiterer Aspekt 48 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen auf der festen Phase als Spots auf einer planen Oberfläche verteilt sind, wobei pro ein Spot Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

Ein weiterer Aspekt 49 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen an den Kügelchen bzw. Partikel befestigt sind, wobei pro ein Kügelchen Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

5

Ein weiterer Aspekt 50 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen in einem Multigefäßsystem, wie Mikrotiterplatte oder Nanotiterplatte oder Pikotiterplatte, verteilt sind, wobei in einem Gefäß des Multigefäßsystems die Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

10

Ein weiterer Aspekt 51 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 35 und 37 bis 50, das folgende Schritte einschließt:

15

a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten

b) Hybridisierung von sequenzspezifischen Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen

20

c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Aspekt 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.

25

d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen

e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen

30

f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen

g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe

gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g),

35

Ein weiterer Aspekt 52 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28-40, wobei die Nukleinsäureketten an eine feste Phase in zufälliger Anordnung gekoppelt sind.

Ein weiterer Aspekt 53 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 41, 52 zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs), bei dem man

5 Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

10 die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, wobei die Dichte der an die Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine optische Detektion der Signale von einzelnen eingebauten Nuk-Makromolekülen zuläßt, man

15 eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

20 a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man

30 b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man

35

c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man

5 d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

10 e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

15 f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

20 wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

25 Ein weiterer Aspekt 54 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus nur jeweils eine Art der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

30 Ein weiterer Aspekt 55 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

35 Ein weiterer Aspekt 56 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils vier unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

Ein weiterer Aspekt 57 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekt 53, dadurch gekennzeichnet, dass die NSKs Varianten einer bekannten Referenzsequenz sind und man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in den Zyklen abwechselnd jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle und zwei unmarkierte NTs einsetzt und man die Gesamtsequenzen durch Vergleich mit der Referenzsequenz ermittelt.

Ein weiterer Aspekt 58 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man in die NSKFs jeweils eine Primerbindungsstelle (PBS) einführt, wobei man bei doppelsträngigen NSKs an beiden komplementären Einzelsträngen jeweils eine PBS einführt und wobei die Primerbindungsstellen für alle NSKFs jeweils gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

Ein weiterer Aspekt 59 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs mit Primern in einer Lösung unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen, und man die gebildeten NSKF-Primer-Komplexe anschließend auf der Reaktionsoberfläche bindet.

Ein weiterer Aspekt 60 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach den Aspekten 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs zunächst auf der Reaktionsoberfläche immobilisiert und erst anschließend mit Primern unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei NSKF-Primer-Komplexe gebildet werden, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

Ein weiterer Aspekt 61 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 53 bis 60, bei dem an 10 bis 100.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt

Ein weiterer Aspekt 62 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 53 bis 60, bei dem an 100.000 bis 10.000.000.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt.

Ein weiterer Aspekt 63 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 62, wobei die Sequenzen der Nukleinsäureketten ermittelt werden

5 Ein weiterer Aspekt 64 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 28 bis 63, wobei die Marker-Komponente fluoreszent markiert ist

Ein weiterer Aspekt 65 der Erfindung betrifft ein Verfahren nach Aspekten 41 bis 64, wobei die feste Phase unabhängig aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist:
10 Silicon, Glas, Keramik, Kunststoffe, Gele oder deren Modifikationen

Gegenüberstellung von Eigenschaften konventionell modifizierter Nukleotide und Nuk-Makromoleküle:

15

Substrateigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide

Der Einfluß unterschiedlicher Linkergrößen, der chemischen Linkerzusammensetzung und die unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit von niedermolekularen Markern auf die Substrat-Eigenschaften der Nukleotide (G. Wright et al. Pharmac.Ther. 1990, V. 47, S. 447, Klevan US Patent 4828979, Lee. et al. Nucleic Acid Research 1992, V. 20, 2471, J. Brandis Nucleic Acid Research, 1999, V.27, 1912) macht deutlich, dass
20 bereits geringfügige Veränderungen an der Nukleotid-, Linker- und Marker-Struktur zu einer starken Veränderung der Substrateigenschaften der modifizierten Nukleotide führen können.

25

Folgerichtig läßt sich nachweisen, dass die Kopplung eines deutlich größeren Moleküls (z.B. eines Proteins) an ein konventionell modifiziertes Nukleotid zur Aufhebung von dessen Substrateigenschaften führt, s. Beispiel 34B.

30 Aus diesem Grund konnten bis jetzt signalverstärkende Makromoleküle nur nach erfolgtem enzymatischem Einbau der Nukleotide in die Nukleinsäurekette mit dem Nukleotid gekoppelt werden, wie beispielsweise markiertes Streptavidin an biotinylierte Nukleotide.

35 Ähnliches lässt sich feststellen, wenn Nukleotid-Monomere in einer Nukleinsäurekette betrachtet werden: nur niedermolekulare Stoffe können beispielsweise an ein Oligonukleotid in der Nähe der 3'-OH-Position gekoppelt werden, falls dieses Oligonukleotid als Primer in weiteren Reaktionen auftreten sollte. Zu große Moleküle,

z.B. Streptavidin, gekoppelt an ein Nukleotid-Monomer am 3'-Ende oder in der Nähe des 3'-Endes eines Oligonukleotids führen zum Verlust der Primereigenschaften. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, kann dies beispielsweise durch sterische Einflüsse der Makromoleküle erklärt werden. Die räumlichen Verhältnisse im aktiven Zentrum vieler Enzyme sind sehr anspruchsvoll und der katalytische Mechanismus vieler Enzyme schließt komplexe konformationelle Änderungen der Enzym-Struktur selber sowie die der Substrate (Nukleotid-Monomere). In vielen Fällen führen auch nur geringfügige chemische Modifikationen an Nukleotid-Monomeren, die als Monomere einer Polymer-Kette auftreten, zu einer veränderten enzymatischen Akzeptanz der Nukleinsäureketten. Ein Beispiel dafür ist die alpha-thiophosphonat-Modifikation der Nukleotid-Monomere, die zur Exonuklease-Resistenz der Nukleinsäurekette führt.

Auch wenn eine Markierung mit Fluoreszenzfärbstoffen einen breiten Einsatz in der modernen Diagnostik und Forschung gefunden hat, besteht nach wie vor ein dringender Bedarf nach Signalverstärkung der biologisch aktiven markierten Molekülen. Man bedient sich oft einer sekundären Signalverstärkung durch Enzymreaktionen.

Trotz der naheliegenden Überlegung, eine mehrfache Markierung in Form einer makromolekularen Marker-Komponente an Nukleotide zu koppeln, gelang es noch nicht, diesen Schritt durch einfache Kombination zwischen konventionellen Nukleotidstrukturen und einer makromolekularen Marker-Komponente unter Beibehaltung der Substrateigenschaft der Nukleotide zu realisieren.

Die Masse der konventionell modifizierten Nukleotide liegt im Wesentlichen im selben Bereich wie bei nicht modifizierten Nukleotiden, und ist relativ gering verglichen mit der Masse von Proteinen, wie z.B. Streptavidin oder Polymerasen. Die Steigerung der Masse des Nukleotids durch Einführung makromolekularer Komponenten kann zu Veränderung von biochemischen und physikalischen Eigenschaften von Nukleotiden führen.

Die Überwindung dieses Nachteils des Standes der Technik gelang überraschenderweise durch die räumliche Trennung zwischen raumfordernden bzw. sterisch anspruchsvollen Bestandteilen der Nuk-Makromoleküle und der enzymatisch aktiven Nuk-Komponente. Diese räumliche Trennung kann beispielsweise durch die Einführung einer wesentlich längeren Linker-Komponente zwischen der Nuk-Komponente und der Marker-Komponente, als es vom Stand der Technik bekannt war, erreicht werden.

Überraschenderweise behalten die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle ihre Substrataktivität trotz der massiven Veränderungen in ihren Eigenschaften bei und können von Enzymen verwendet als Substrate werden. So bauen beispielsweise
5 Polymerasen die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle in den wachsenden Strang ein. Terminale deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) können Nuk-Makromoleküle an ein 3'-Ende einer Nukleinsäure koppeln (Beispiel 34B,C und Beispiel 35).

Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass die Masse der
10 erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle ein vielfaches der natürlichen Nukleotide bildet und einen großen Einfluß auf die Nuk- Komponente ausübt.

Einsatzgebiete der Nuk-Makromoleküle:

Die Kopplung eines makromolekularen Markers an ein Substrat für Enzyme, an ein
15 Nukleotid, bietet die Möglichkeit eines breiten Einsatzes dieser Nuk-Makromoleküle in unterschiedlichen Anwendungen in der Biotechnologie, Medizin und Wissenschaft.

Erfindungsgemäß können Nuk-Makromoleküle in Verfahren eingesetzt werden, bei
20 denen Sie als Substrate für Enzyme dienen.

In einer Ausführungsform der Erfindung werden Nuk-Makromoleküle in den Verfahren zur Markierung von Nukleinsäuren eingesetzt. Dabei erfolgt eine Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen nach allgemeinen Regeln der enzymatischen Verlängerungsreaktion von Nukleinsäureketten, ("Molecular Cloning", J. Sambrook, 3.
25 Ed. 2001).

Der große Vorteil eines makromolekularen Markers pro ein eingebautes Nukleotid liegt in einer wesentlich höheren Signalstärke im Vergleich zu herkömmlichen modifizierten Nukleotiden.
30

Ein weiterer Vorteil ist die große Distanz des Markers zum Nukleinsäurestrang, so dass nur geringfügige Wechselwirkung zwischen dem Marker und dem Nukleinsäurestrang zu erwarten sind. Dies hat einen Einfluß beispielsweise auf die Fluoreszenzeigenschaften der Marker: Die Fluoreszenz der Marker wird von den
35 Nukleobasen (Purine und Pyrimidine) nicht gequencht. Falls mehrere Nuk-Makromoleküle in einer Nukleinsäurekette eingebaut sind, führt eine größere Distanz zwischen dem Marker und der Nukleotid-Komponenten zu einer deutlichen Verminderung der Interaktion zwischen Markern von benachbarten Nukleotiden.

Erfolgt die Markierung einer Nukleinsäurekette beispielsweise während der enzymatischen Synthese dieser Kette durch den Einbau von Nuk-Makromolekülen, so sind unter Umständen keine weiteren mehrstufigen Signalamplifikationsschritte mehr notwendig. Viele der bekannten Signalamplifikationsschritte, z.B. Biotin-Streptavidin-Antikörper, oder Digoxigenin-Antikörper I -Antikörper II laufen mit nur mäßigen Ausbeuten ab, wie z.B. Signalamplifikationen bei FISH-Analysen. Schwankende und schwache Ausbeuten in der Markierung verursachen ebenfalls Schwankungen und Schwäche im Signal, was zu Fehlinterpretationen führen kann. Durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen kann die Schwäche der Markierung beseitigt werden. Durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen mit konstanten Signalmengen können auch die Schwankungen weitgehend ausgeglichen werden.

Die Markierung von Nukleinsäuren kann in unterschiedlichen Verfahren eingesetzt werden. Die konkreten Bedingungen der Nukleinsäurevorbereitung, die Reihenfolge der enzymatischen Schritte und Detektionsvorgänge hängen im einzelnen vom Verfahren ab, in dem die Markierung eingesetzt wird.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle eine überdurchschnittliche Verbesserung der Markierungsstrategien der Nukleinsäureketten ermöglichen.

Modifizierte Nukleinsäureketten

In einer Ausführung der Erfindung schließen Nukleinsäureketten Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle als Einheiten der Kette ein. Die Nuk-Makromoleküle werden als Monomere einer Polymerkette, der Nukleinsäurekette, betrachtet. Solche Nukleinsäureketten mit integrierten Nuk-Makromolekülen können als Sonden und als Reaktionspartner in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden (z.B. Real-Time-PCR, Ligase-Ketten-Reaktion).

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 5'-Ende der Nukleinsäurekette integriert. In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 3'-Ende der Nukleinsäurekette integriert. In einer weiteren Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül im Inneren der Nukleinsäurekette integriert, wobei der Abstand vom am nächsten liegenden Kettenende in folgenden Bereichen liegt (Zahl der Monomeren der Kette bis zum nächsten Kettenende): 1 bis 2, 2 bis 4, 4 bis 8, 8 bis 15, 15 bis 30, 30 bis 100, 100 bis 500.

Ein Nuk-Makromolekül kann mehrere Nuk-Komponente einschließen. In einer Ausführungsform wird nur eine Nuk-Komponente eines Nuk-Makromoleküls in eine Nukleinsäurekette integriert, die anderen Nuk-Komponenten liegen in Monomer-Form vor. In einer anderen Ausführungsform können mehrere Nuk-Komponenten eines Nuk-Makromoleküls in unterschiedliche Nukleinsäureketten integriert werden, wobei die Nukleinsäureketten unter einander identische oder auch unterschiedliche Sequenzen aufweisen können.

Besonders vorteilhaft ist der Einsatz mit Nuk-Makromolekülen modifizierter Nukleinsäureketten dann, wenn Nuk-Makromolekül als Teil einer Polymer-Kette an einer enzymatischen Reaktion / Umwandlung teilnimmt oder sich in unmittelbaren Nähe vom an der Reaktion teilnehmenden Nukleotid befindet. Durch den langen Linker der Nuk-Makromolekülen wird der Einfluß einer makromolekularen Marker-Komponente auf das Enzym stark reduziert, so dass die modifizierten Nukleotid-Komponenten an den enzymatischen Reaktionen (z.B. Primer-Funktion bei einer matrizen-abhängigen, polymerase-gesteuerten Reaktion, bei einer Ligase-abhängigen Reaktion (z.B. Ligase-Ketten-Reaktion), 3'-Exonuklease oder 5'-Exonuklease-Aktivitäten verschiedener Enzyme, Endonuklease-Spaltung,) teilnehmen können, bzw. die Reaktion an benachbarten Nukleotiden nicht beeinträchtigen (J. Wilhelm "Entwicklung Real-Time-PCR-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik" Dissertation, 2003, Gießen, S. Meuer "Rapid cycle real time PCR", Springer 2004, ISBN 3-540-66736-9, T. Weissensteiner "PCR-Technology: current innovations" CRC Press 2004 ISBN 0-8493-1184-5). Der Abstand zwischen der Position des Nuk-Makromoleküls in der Nukleinsäurekette und dem Nukleotid derselben Nukleinsäurekette, das als Substrat an der enzymatischen Reaktion teilnimmt, liegt beispielsweise in folgenden Bereichen (Zahl von Nukleotiden): 0 bis 3, 3 bis 6, 6 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 40. Zahl 0 bedeutet, dass das Nuk-Makromolekül direkt an das an der Reaktion teilnehmende Nukleotid gekoppelt ist.

Im weiteren folgen einige Beispiele zum Einsatz der Nuk-Makromoleküle.

Verfahren in der Flüssigphase

In einer Ausführungsform der Markierungsverfahren befinden sich die zu markierenden Nukleinsäureketten in der Flüssigphase, s. Beispiel 34, 35.

Viele andere Verfahren, z.B. PCR, Nick-Translation, Random-Primer-Reaktion, reverse Transkription mit Reversen Transkriptasen und Transkription mit RNA-Polymerasen ("Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001) können mit erfindungsgemäßen Nuk-Makromolekülen durchgeführt werden. Dabei werden Nuk-Makromoleküle ähnlich zu

konventionell mit Farbstoff modifizierten Nukleotiden in die Reaktion zugegeben. Allgemeine Regeln der Verwendung konventionell modifizierter Nukleotide, wie beispielsweise dCTP-Cy3 (Amersham Bioscience) oder dUTP-TMR (NEN) sind ausführlich in Literatur beschrieben ("Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001).

5 Beispielsweise kann für die Kopplung eines einzelnen komplementären Nukleotids an den Primer eine Art der Nuk-Makromoleküle, z.B. dATP oder dCTP, verwendet werden. Bei den meisten Reaktionen werden allerdings Gemische aus modifizierten und nicht modifizierten Nukleotiden eingesetzt (H. Yu et al. *Nucleic Acid Research* 1994, v. 22 3226-, "Molecular Cloning", J. Sambrook, 3. Ed. 2001). Beispielsweise können nicht
10 markierte und markierte Nukleotide für eine Markierung mit einem Nuk-Makromolekül, bei dem dUTP als Nuk-Komponente auftritt, in folgenden Verhältnissen gemischt werden:

dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,5:0,5

dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,7:0,3

15 dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,9:0,1

oder dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,7:0,3

oder dATP : dCTP : dGTP : dTTP : dUTP-Nuk-Makromolekül = 1:1:1:0,95:0,05

die genaue Mischverhältnisse können für einzelne Markierungsreaktionen optimiert werden.

20 Auch mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle können in einer Reaktion eingesetzt werden. Beispielsweise können Nuk-Makromoleküle unterschiedliche Markierung tragen. In einer Ausführungsform werden die Marker der Nuk-Makromoleküle so gewählt, dass sie ein FRET-Paar bilden (Faner, R et al. *Hum Immunol* 2004, v.65, 826-38, Lazowski, K. W et al. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000, v.10, 97-103,
25 Talavera, E. M., *Appl Spectrosc* 2003, v.57, 208-15, Tsourkas, A. et al. *Anal Chem*, 2003, v. 75, 3697-703, Singh, K. K., et al. *Methods Mol Biol* 2004, v.252, 33-48, Wang, L., *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2004, v.60, 2741-50). Nach dem Einbau solcher Nuk-Makromoleküle in die wachsende Nukleinsäurekette

verringert sich die durchschnittliche Distanz zwischen den Fluorophoren, so dass es bei

30 der Anregung des Donors zu FRET an den Akzeptor kommt. Da die Nuk-Makromoleküle eine deutlich stärkere Markierung tragen als die konventionell modifizierten Nukleotide, kann die Signalintensität eines FRET-Signal deutlich größer sein. Die genauen Bedingung der Reaktion können im Hinblick auf die Wahl der

Fluorophore, ihre Kopplung im Nuk-Makromolekül, die Konzentration der Nuk-

35 Makromoleküle und Verhältnis zwischen den Nuk-Makromolekülen und nicht markierten Nukleotiden optimiert werden. Als generelle Regel gilt dabei, dass die durchschnittliche Distanz zwischen den Fluorophoren eines FRET-Paars sollte unter 10 nm liegen.

Festphasenverfahren

In einer weiteren Ausführungsform der Markierungsverfahren sind die zu markierenden Nukleinsäureketten oder deren komplementären Stränge an einer festen Phase fixiert. Viele Verfahren zur Markierung von immobilisierten Nukleinsäureketten mit konventionell modifizierten Nukleotiden sind bekannt (Suomalainen A et al. Methods Mol Biol. 2003, Pirrung MC et al. Bioorg Med Chem Lett. 2001 Sep 17;11(18):2437-40). Beispiele für die feste Phase stellen Mikrokügelchen (Spherotech Inc, Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17µ). Im Beispiel 34C wird eine Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen an fester Phase beschrieben. Ein weiteres Beispiel für die feste Phase stellen planare Oberflächen, an die Nukleinsäuren gebunden sind.

Die Nuk-Makromoleküle eignen sich für Analysenverfahren mit einer Einbaureaktion an den an einer festen Phase gekoppelten Nukleinsäuren, sie können ähnlich zu konventionell modifizierten Nukleotiden in vielen Verfahren eingesetzt werden, wie beispielsweise Minisequencing (Suomalainen A et al. Methods Mol Biol. 2003;226:361-6, Liljedahl U et al. Pharmacogenetics. 2003 Jan;13(1):7-17, Olsson C et al. Methods Mol Biol. 2003;212:167-76), Primer-Extension (Pirrung MC et al. Bioorg Med Chem Lett. 2001 Sep 17;11(18):2437-40, Cai H, et al. Genomics. 2000 Jun 1;66(2):135-43, Kurg A et al. Genet Test. 2000;4(1):1-7, Pastinen T et al. Genome Res. 1997 Jun;7(6):606-14). US pat. 6287766, US pat. 2003148284, US pat. 2003082613, EP 1256632, WO0194639, WO 2004/076692, Ju et al. US Pat. 6664079. Fest-Phasen-PCR (WO 9626291, WO 9409156, US Pat. 6221635), Sequenzierung durch die Synthese (Ju et al US Pat. 6664079), Single-Molecular-Sequencing (Tcherkassov WO 02088382, Seeger WO 0018956, Kartalov WO 02072892). In vielen Fällen erfolgt dabei eine Synthese der komplementären Stränge an den fixierten Primer-Matrizen-Komplexen.

Viele Analyse-Verfahren bei denen Nukleinsäureketten fixiert sind, benötigen routinemäßig Vervielfältigungsschritte. In solchen Verfahren können Nuk-Makromoleküle einen besonders großen Vorteil bringen, da die Signal-Intensität überdurchschnittlich gesteigert wird. Die Zahl der signalgebenden Marker-Einheiten von Nuk-Makromolekülen kann eine noch während der Synthese festgelegte Größe aufweisen, so dass die Intensität des Signal von den eingebauten Nuk-Makromolekülen quantifiziert werden kann.

Bei solchen Verfahren können Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die fluoreszente, radioaktive oder Enzyme als Marker-Einheiten einschließen.

Sehr vorteilhaft bei solchen Verfahren ist die Verwendung von Nuk-Makromolekülen mit Fluoreszenzsignalen, da die Fluoreszenz eine hohe Sensitivität aufweist.

In einer Ausführung solcher Verfahren erfolgt die Detektion der Fluoreszenz-Signale von den Markern der eingebauten Nuk-Makromoleküle. Dabei können auch FRET-Paare zwischen einzelnen Nuk-Makromolekülen verwendet werden. In einer weiteren Ausführung können bei der Markierung an einer festen Phase fixierten Nukleinsäureketten markierte Primer eingesetzt werden, wobei die Primer in einer Ausführungsform einen oder mehrere Nuk-Makromoleküle einschließen und in einer weiteren Ausführungsform eine konventionelle Markierung einschließen.

In diesen beiden Ausführungsformen kann die Markierung am Primer als ein Teil eines FRET-Paars auftreten. Der an Primer gekoppelte Partner eines FRET-Paars kann dabei als Donor als auch als Akzeptor während der Detektion auftreten. Die eingebauten Nuk-Makromoleküle mit einem entsprechenden Partner des FRET-Paars können dabei einen abspaltbaren oder auch einen nicht abspaltbaren Marker tragen.

Durch den Einsatz des FRET zwischen den eingebauten Nuk-Makromolekülen oder der Primer-Markierung und den eingebauten Nuk-Makromolekülen kann eine große Steigerung der Signalspezifität erzielt werden. Die Detektion kann dabei in einer Ausführungsform während des Einbaus in einer anderen Ausführungsform als separater Schritt des Verfahrens erfolgen.

In einer Ausführungsform tragen Nuk-Makromoleküle mit Nuk-Komponente einer Art (beispielsweise dTTP) vorzugsweise eine für sie spezifischen Marker-Komponente, so dass beispielsweise 4 Arten der Nuk-Makromoleküle (entsprechend dem dTTP, dCTP, dATP und dGTP) gleichzeitig eingesetzt und unterschieden werden können. Andere Markierungsschemata sind bekannt s. z.B. Tcherkassov WO 02088382. Je nach Verfahren werden auch nicht markierte, z.B. natürliche Nukleotide in das Reaktionsgemisch zusammen mit den Nuk-Makromolekülen zugegeben.

In einer Ausführungsform der Markierungsverfahrens werden Nuk-Makromoleküle eingesetzt, die den Einbau nur einer einzelnen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang erlauben und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird. Der weitere Einbau kann sowohl reversibel als auch irreversibel verhindert werden. Ein irreversibler Stopp kann beispielsweise durch den Einsatz von Nuk-Makromolekülen erreicht werden, die als Nuk-Komponente ein Dideoxi-Nukleosidtriphosphat einschließen. Ein reversibler Stopp kann in einem weiteren Verfahrensschritt aufgehoben werden, so dass weitere Einbaureaktionen stattfinden

können. Beispiele für eine reversible Blockade der Reaktion sind in Anmeldungen (Metzker et al. Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642, Tcherkassov WO 02088382, Ju et al. US Pat. 6664079, Milton et al. WO 2004018497, Milton et al. WO 2004018493, Balasubramanian et al. WO 03048387) beschrieben.

In einer anderen Ausführungsform verhindern die bereits eingebauten Nuk-Makromoleküle den weiteren Einbau von Nukleotiden nicht. Falls ein Gemisch aus modifizierten und nicht modifizierten Nukleotiden eingesetzt wird, können nach dem Einbau von einem Nuk-Makromolekül auch weitere Nuk-Makromoleküle in den wachsenden Strang nacheinander eingebaut werden.

Die feste Phase kann beispielsweise eine plane Oberfläche oder Kügelchen (Beads) oder eine Art von Multigefäßarrays (z.B. Microtiterplatte, Nanotiterplatte) darstellen. Dabei können Nukleinsäuren mit verschiedenen Methoden an die feste Phase gekoppelt werden (McGall et al. US Patent 5412087, Nikiforov et al. US Patent 5610287, Barrett et al. US Patent 5482867, Mirzabekov et al. US Patent 5981734, "Microarray biochip technology" 2000 M.Schena Eaton Publishing, "DNA Microarrays" 1999 M. Schena Oxford University Press, Rasmussen et al. Analytical Biochemistry v.198, S.138, Allemand et al. Biophysical Journal 1997, v.73, S.2064, Trabesinger et al. Analytical Chemistry 1999, v.71, S.279, Osborne et al. Analytical Chemistry 2000, v.72, S.3678, Timofeev et al. Nucleic Acid Research (NAR) 1996, v.24 S.3142, Ghosh et al. NAR 1987 v.15 S.5353, Gingeras et al. NAR 1987 v.15 S.5373, Maskos et al. NAR 1992 v.20 S.1679). Es sind Verfahren zur Vervielfältigung der Nukleinsäureketten ausgehend von einzelnen Molekülen beschrieben. Solche Verfahren können zur Ausbildung ortsspezifisch gebundener Populationen der Nukleinsäureketten mit identischer Sequenz eingesetzt werden, wobei sowohl plane Oberflächen als auch Beads verwendet werden können. Vorzugsweise sind die zu analysierenden Nukleinsäurestränge mit einem Primer versehen, so dass es ein Primer-Matrizen-Komplex ausgebildet ist und daran eine enzymatische Synthese eines komplementären Stranges stattfinden kann ("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001).

35 Primer-Extension:

In einer Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase

fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

- 5 1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen
- 2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.
- 10 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase
- 4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.

Sequenzierung:

- 15 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen an einer einzigen Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk-Komponente abgetrennt
- 20 wird.

Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

- 1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen
- 2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.
- 25 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase
- 4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.
- 30 5) Entfernung der Marker-Komponente von den eingebauten Nuk-Makromolekülen
- 6) Wiederholung der Schritte 2 bis 5

Die Wiederholung kann beispielsweise 1 bis 2, 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 30 mal durchgeführt werden.

- 35 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt der Einbau von Nuk-Makromolekülen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der

festen Phase haben, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach dem Einbau am verlängerten Primer verbleibt und nicht abgetrennt wird.

Die adressierbaren Positionen können beispielsweise die Form von Spots haben, im Falle einer planen Oberfläche. Bei der Verwendung von Kügelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kügelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays (z.B. Mikrotiter-Platte, oder Nanotiter-Platte) sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

10 Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen
2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.

3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase

4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.

20 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt der Einbau von Nuk-Makromolekülen in einer enzymatischen Reaktion parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Populationen adressierbare Positionen an der festen Phase haben. Die einheitlichen Nukleinsäurepopulationen können durch unterschiedliche Verfahren an die Oberfläche fixiert werden (s.o.). Die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls wird bei dieser Ausführungsform während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt. Für solche Verfahren eignen sich Nuk-Makromoleküle mit spaltbaren Verbindungen im Linker. Die adressierbaren Positionen können beispielsweise die Form von Spots haben, im Falle einer planen Oberfläche. Bei der Verwendung von Kügelchen als feste Phase werden unterschiedliche Populationen von Nukleinsäuren an unterschiedlichen Kügelchen fixiert. Bei der Verwendung von Multigefäßarrays sind einzelne Nukleinsäurepopulationen in einzelnen Gefäßen getrennt fixiert.

35

Solche Verfahren schließen im wesentlichen folgende Schritte ein:

1) Bereitstellung einer festen Phase mit fixierten Primer-Matrizen-Komplexen

2) Inkubation der bereitgestellten festen Phase mit einer Reaktionslösung, die eine oder mehrere Arten der Polymerasen, eine oder mehrere Arten der Nuk-Makromoleküle enthält, wobei die Nuk-Makromoleküle durch ihre Markierung eindeutig identifiziert werden können.

5 3) Entfernung der Reaktionslösung und waschen der festen Phase

4) Detektion der Signale von eingebauten Nuk-Makromolekülen und die Zuordnung der Art der eingebauten Nuk-Makromoleküle aufgrund ihrer Signaleigenschaften.

5) Entfernung der Marker-Komponente von den eingebauten Nuk-Makromolekülen

6) Wiederholung der Schritte 2 bis 5

10 Die Wiederholung kann beispielsweise 1 bis 2, 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 30, 30 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200 mal durchgeführt werden.

Ein einer Ausführungsform eines solchen Verfahrens werden im Schritt (2) Nuk-Makromoleküle zusammen mit den anderen modifizierten Nukleotiden eingesetzt.

15 Dabei erfolgt die Synthese des komplementären Stranges schrittweise: pro ein Syntheseschritt werden komplementäre Stränge maximal um ein Nukleotid verlängert.

Die Kontrolle der enzymatischen Reaktion erfolgt dabei durch reversible Terminatoren.

Vorzugsweise werden die an 3'-OH-Gruppe modifizierten Terminatoren eingesetzt, die keine weiteren Modifikationen an der Base tragen. Nach der Abspaltung der

20 Modifikation vom eingebauten Nukleotid kann weitere Synthese an diesen Strängen stattfinden. Die Struktur der in dieser Ausführungsform eingesetzten Nuk-Makromoleküle kann unterschiedlich sein. Vorzugsweise sind es terminierende Nuk-Makromoleküle, d.h. nach ihrem Einbau kann kein weiteres Nukleotid durch eine

Polymerase eingebaut werden. Der Linker ist vorzugsweise an die Base der Nuk-Komponente gekoppelt und schließt eine spaltbare Verbindung ein. Das

25 Zusammenmischen der Nuk-Makromoleküle mit terminierenden Eigenschaften und der reversiblen Terminatoren erlaubt an einer Population der Nukleinsäureketten die Markierung und die reversible Termination zu trennen. Da die Nuk-Makromoleküle in

dieser Ausführungsform des Verfahrens terminierend wirken, steht in jedem weiteren

30 Einbauschritt eine geringere Anzahl an Strängen für weitere Sequenzierungsreaktion zur Verfügung. Damit eine Einbaureaktion in weiteren Schritten stattfinden kann, muß ein Teil der Stränge in jedem Schritt reversibel blockiert werden. Der Anteil der mit

Nuk-Makromolekülen modifizierten Nukleinsäureketten kann sehr gering sein, da die Signalstärke der Nuk-Makromoleküle sehr groß sein kann. Das Verhältnis zwischen

den Nuk-Makromolekülen und reversiblen Terminatoren in einem Reaktionsschritt

35 kann beispielsweise in folgenden Bereichen liegen: zwischen 100 :1 und 1:10, zwischen 10 :1 und 1:1, 1 :1 und 1:10, zwischen 1:10 und 1:100, zwischen 1:100 und 1:1000 (Konzentration von Nuk-Makromoleküle : Konzentration von reversiblen

Terminatoren). Dieses Verhältnis kann während der gesamten Sequenzierungsreaktion konstant bleiben oder variieren. Da Polymerasen die Nuk-Makromoleküle und die reversible Terminatoren unterschiedlich gut akzeptieren können, können mehrere Polymerase-Arten während des Einbauschriffs eingesetzt werden.

- 5 Die Entfernung der Signale nach der Detektion führt zu einem besseren Signal-Rauschen-Verhältnis bei den nächsten Detektionen und ist typisch für die Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese. Die Aufhebung der reversiblen Terminierung kann in einem eigenen Schritt erfolgen oder beispielsweise mit dem Schritt der Entfernung der Markierung zusammenfallen.
- 10 Der Vorteil des Einsatzes der Nuk-Makromoleküle besteht darin, dass die Markierung eines geringen Anteils der Gesamtpopulation zur Detektion des Einbauereignisses ausreicht. Dies erlaubt mit wesentlich geringeren Mengen des Ausgangsmaterials die Sequenzierungsreaktion durchzuführen. Die Verwendung von reversiblen Terminatoren mit einer Schutzgruppe an der 3'-Position und einer Base ohne Modifikation führt
- 15 dazu, dass das nach der Entfernung der blockierenden Gruppe in der Nukleinsäurekette verbleibende Nukleotid keine weiteren Modifikationen trägt und somit als natürliches Substrat von Polymerasen gut akzeptiert wird.

In einer weiteren Ausführungsform des Verfahren, werden folgende Schritte

20 durchgeführt:

- a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten
- b) Hybridisierung von sequenzspezifischen Primern an diese
- 25 Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
- c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Aspekten 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Aspekt 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter
- 30 Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
- d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
- 35 e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
- f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen

g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe
gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g),

5 In einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens erfolgt die Einbaureaktion von NT-Makromolekülen gleichzeitig an einer Population unterschiedlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle, wobei diese Nukleinsäuremoleküle in einer zufälligen Anordnung an die feste Phase gebunden sind (Tcherkassov WO 02088382). Bei diesem Verfahren werden Sequenzen von einzelnen Nukleinsäurekettenmolekülen ermittelt. Die an der enzymatischen Reaktion teilnehmende Primer-
10 Nukleinsäurekomplexe sind in einer Dichte fixiert, die die Detektion der Signale von einzelnen Nuk-Makromolekülen ermöglicht, die an ein einzelnes Nukleinsäure-Molekül gekoppelt sind, wobei die Dichte der fixierten Primer oder Nukleinsäuren wesentlich höher liegen kann. Beispielsweise beträgt die Dichte der an der Einbaureaktion teilnehmenden Primer-Nukleinsäurekomplexe von 1 Komplex auf $10\mu\text{m}^2$ bis 1 Komplex
15 auf $100\mu\text{m}^2$, von 1 Komplex auf $100\mu\text{m}^2$ bis 1 Komplex auf $1000\mu\text{m}^2$, von 1 Komplex auf $1000\mu\text{m}^2$ bis 1 Komplex auf $10.000\mu\text{m}^2$.

Beispiele der Fixierung der Nukleinsäuren an die feste Phase mit einer Auflösung, die Analysen an einzelnen Molekülen erlaubt sind in WO0157248, US Pat. 2003064398, US Pat.2003013101 und WO 02088382 dargestellt. Eine passende
20 Detektionsapparatur ist in der Anmeldung WO 03031947 beschrieben.

Die Zahl der parallel zu analysierenden einzelnen Nukleinsäuremoleküle liegt beispielsweise zwischen 1000 und 100.000, 10.000 bis 1.000.000, 100.000 bis 10.000.000 Moleküle. Wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen
25 Komponenten mit oder ohne Linker- Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Einbaureaktion oder nach der Einbaureaktion von der Nuk- Komponente abgetrennt wird..

Dieses Verfahren zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs) schließt folgende Schritte ein, man:

- 30
- Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

- die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, wobei die Dichte der an die Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine optische Detektion der Signale von einzelnen eingebauten Nuk-Makromolekülen zuläßt, man

- eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSKF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man

b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man

c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man

d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

Anwendung von Nukleinsäureketten, die Nuk-Makromoleküle einschließen.

Nach dem Einbau eines Nuk-Makromolekül an das 3'-Ende der Nukleinsäure behalten die nun ihrerseits modifizierten Nukleinsäureketten überraschenderweise die Fähigkeit zur Kopplung weiterer Nukleotide an die 3'-Hydroxylgruppe durch Polymerasen, s. Beispiel 34C. Dies bedeutet, dass nicht nur die Nuk-Komponente in den Nuk-Makromolekülen sondern auch die mit diesen Nuk-Makromolekülen modifizierten Nukleinsäureketten für die Enzyme zugänglich bleiben können und in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie eine Anwendung finden. Nicht nur am 3'-Ende mit Nuk-Makromolekülen modifizierte Nukleinsäureketten, sondern Nukleinsäureketten, die am 5'-Ende oder im inneren Bereich des Nukleinsäurepolymers eines oder mehrere Nuk-Makromoleküle als Monomere einschließen, behalten ihre Substrateigenschaften für Polymerasen, Exonukleasen und Ligasen. Beispiele für die Anwendungen von mit Nuk-Makromolekülen modifizierten Oligonucleotiden sind dem Fachmann bekannt, z.B. in den Primer-Extension-Reaktionen, Real Time PCR oder Ligase-Reaktionen.

Wahl der Enzyme:

Nukleotide spielen als Monomere eine zentrale Rolle in unterschiedlichen Stoffwechselvorgängen, beispielsweise bei der Speicherung und Übertragung der genetischen Information in der Zelle ("Genes V" B. Lewin, 1994). Auch sind Nukleotide als Energieträger der Zelle bekannt (ATP, UTP), oder Signalvermittler (Messenger, GTP) der intrazellulären Signalvermittlung ("Biochemie und Pathobiochemie", G. Löffler,

2003). Aus diesem Grund werden Nukleotide und ihre Analoga als Therapeutika und Diagnostika eingesetzt.

Gekoppelt in Nukleinsäurepolymere (Nukleinsäureketten) stellen die Nukleotid-Monomere die Basis für die Informationsspeicherung in den lebenden Organismen dar.

5

Nuk-Makromoleküle haben das Potenzial, in unterschiedlichen Bereichen der Biotechnologie eine Anwendung zu finden.

Die Möglichkeit einer Kopplung der Nukleotide an ein Makromolekül unter Beibehaltung der Substrateigenschaften der Nukleotide eröffnet viele Wege auch für eine gezielte Adressierung der modifizierten Nukleotiden innerhalb eines Organismus oder einer Zelle, so dass Nuk-Makromoleküle ein neues grundsätzliches Model für Nukleotid-Prodrugs darstellen.

Als Enzyme können beispielsweise unterschiedliche Sorten von Polymerasen verwendet werden ("DNA Replication", Kornberg, 2. Ed. 1992), im einzelnen DNA-abhängige DNA-Polymerasen, RNA-abhängige DNA-Polymerasen, DNA-abhängige RNA-Polymerasen und RNA-abhängige RNA-Polymerasen. Dabei können sowohl thermostabile als auch thermolabile Polymerasen verwendet werden, wie beispielsweise Klenow-Polymerase oder Taq-Polymerase. Andere Beispiele für mögliche Polymerasen findet ein Fachmann in der hier zitierten Literatur. Ein weiteres Beispiel für Enzyme stellen Transferasen, wie Terminale Deoxynucleotidyltransferase ("Molecular Cloning", Maniatis, 3. Ed. 2001), dar. Auch andere Enzyme und Proteine (beispielsweise Kinasen, Membranrezeptoren) die Nukleotide als Substrate), Energiequelle, Cofaktoren oder als Messenger-Substanzen akzeptieren können verwendet werden.

Enzyme unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, modifizierte Nukleotide als Substrate zu akzeptieren. Einem Fachmann sollte es naheliegend erscheinen, dass verschiedene funktionelle Tests eingesetzt werden müssen, um bestimmte Eigenschaften von Nukleotiden zu untersuchen und anzuwenden. Beispiele für unterschiedliche Testabläufe für die Markierung von Nukleinsäuren sind in H. Held et al. Nucleic Acid Research 2002, V. 30, S. 3857, M. Metzger et al. Nucleic Acid Research 1994, V. 22, 4259, M. Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta 1994, V.77, S. 586, B. Canard et al. PNAS 1995, V. 92, S. 10859, Canard US Pat. 5798210, J. Hovinen et al. J. Chem. Soc. Perkin 1994, 1994, 211 und auch in anderen hier zitierten Patenten und Publikationen angegeben.

Die passenden Kombinationen zwischen Polymerasen und modifizierten Nukleotiden können für den jeweiligen Zweck entsprechend gewählt werden. Beispiele für den Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer sind in Beispiel 34 angegeben. Die angegebenen Beispiele dienen nicht zur Einschränkung der Verwendungsmöglichkeit von Nuk-Makromolekülen, sondern sollten dem Fachmann den Unterschied in Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle zu den konventionellen modifizierten NT darstellen.

Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenprodukte können auch in der konventionellen chemischen Oligonucleotidsynthese verwendet werden, beispielsweise in einer Festphasensynthese (Giegrich, "Neue photolabile Schutzgruppen für die lichtgesteuerte Oligonucleotidsynthese", 1997, Beier, "Neue Strategien zum Aufbau von RNA- und DNA-Oligonucleotiden", 1996), dabei trägt die Nuk-Komponente der Nuk-Makromoleküle entsprechende Modifikationen, die eine chemische Kopplung an die Nukleinsäurekette erlaubt, wie beispielsweise in Herrlein, "Synthese von modifizierten Nukleosiden, Nukleotiden und Oligonukleotiden", 1993, Gugler, "Aufbau und Anwendung von Systemen zur vereinfachten chemo-enzymatischen Synthese von Oligonukletid-Hybridisierungssonden", 1993, Schmidt, "Neue Methoden zur Synthese und Isolierung langkettiger Oligonucleotide", 1991, Bühler, "Neue photolabile Schutzgruppen für die Oligonucleotidsynthese", 2000, Bretzger, "Wege zur präparativen Oligonucleotidsynthese" 1991, Stengele, "Automatisierte Oligonucleotidsynthese unter Verwendung [beta]-eliminierbare Schutzgruppen", 1991).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Methode zur schnellen Reinigung der von markierten Nukleotiden direkt vor ihrem Einsatz in die Markierungsreaktion.

Verfahren zur Sequenzierung einzelner Moleküle (z.B. Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Kartalov WO02072892) benötigen markierte Nukleotide in einem sehr sauberen Zustand, weil Verunreinigungen einer markierten Nukleotidpräparation mit nicht markierten Nukleotiden einen Sequenzfehler verursachen können. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass die markierten Nukleotide möglichst frei von nicht markierten Nukleotiden sind. Viele Nukleotidmodifikationen, die in solchen Verfahren eingesetzt werden, haben eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Gruppe (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382)

Während der Lagerung können solche Nukleotide zu einem Teil zerfallen und stellen die Quelle für Nukleotidanaloga ohne Markierung dar, die beim Einbau in die Nukleinsäure zu einem Sequenzfehler führen würden.

- 5 Dieses Problem führt dazu, dass eine Reinigung direkt vor dem Einsatz markierter Nukleotide durchgeführt werden muß. Eine Standardreinigung für modifizierten Nukleotide ist beispielsweise eine HPLC-Reinigung mit Wasser-Methanol-Gradient. Nach einer solchen Reinigung muß die Fraktion mit modifizierten Nukleotiden aufgearbeitet werden, beispielsweise durch Lyophilisation. Eine solche Reinigung stellt
10 eine aufwendige Prozedur dar.

Nuk-Makromoleküle können erfindungsgemäß direkt vor dem Gebrauch durch eine Ultrafiltration von geringsten Verunreinigungen befreit werden.

- Es werden Filter mit einer Porengröße ausgewählt, die für Nukleotide ohne Marker-
15 Anteile frei passierbar sind. Die mit einem makromolekularen Marker modifizierten Nukleotide können aber durch den Filter nicht durchgehen. Durch eine solche Reinigung gelingt es in kurzer Zeit Nuk-Makromoleküle in einem sehr sauberen Zustand zu erhalten.

- 20 Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von modifizierten Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase zusammen mit den Nuk-Makromolekülen in den enzymatischen Reaktionen, wobei die SH-Gruppe des Cysteins des Klenow-Fragments Exo-minus der DNA-Polymerase chemisch modifiziert ist.

- Diese Modifizierung ist vorzugsweise eine kovalente Modifizierung. Beispiele für eine
25 solche Modifizierung stellt eine Alkylierung an der SH-Gruppe dar, z.B. mit alpha-Halogen-Acetyl-Derivate, wie beispielsweise Iodacetamid und seinen Derivaten, Iodacetat und seinen Derivaten, oder mit N-Maleimid-Derivaten, weitere selektive SH-Gruppen Reagenten sind in „Chemistry of protein conjugation and crosslinking“ Shan S. Wong 1993 CRC Press Inc. beschrieben. Diese Modifizierung kann auch durch einen
30 Fluoreszenzfarbstoff erfolgen. Aktivierte Fluoreszenzfarbstoffe, die selektiv mit SH-Gruppen reagieren, sind kommerziell erhältlich, z.B. von Molecular Probes Inc.

- In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt eine selektive Modifikation des Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase an SH-Gruppe des Cysteins. Beispiel für die Herstellung eines solchen Klenow-Fragments Exo-minus der
35 DNA-Polymerase ist unter Beispiel 43 angegeben.

In einer anderen Ausführungsform können auch andere Modifikationen an der DNA-Polymerase vorgenommen werden, wie beispielsweise Kopplungen an Amino-Gruppen der DNA-Polymerase.

Das an dem Cysten modifizierte Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase kann in einer Ausführungsform an stelle eines nicht modifizierten Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase zusammen mit Nuk-Makromolekülen in der enzymatischen Einbau-Reaktion eingesetzt werden.

5

Allgemeine Hinweise für die Synthesen von Nuk-Makromolekülen

Die erfindungsgemäßen Nuk-Makromoleküle können auf unterschiedliche Art und Weise synthetisiert werden. Die Reihenfolge der Kopplungsschritte kann variieren.

- 10 Beispielsweise kann zunächst eine Linker-Komponente an die Nuk-Komponente gekoppelt werden, anschließend wird die Marker-Komponente gekoppelt. Andererseits können ein oder mehrere Linker an die Marker-Komponente gekoppelt werden und anschließend der / die Nuk-Komponenten.

- 15 Die Kopplung zwischen einzelnen Komponenten der Nuk-Makromoleküle kann kovalent oder affin erfolgen. Wobei sowohl chemische als auch enzymatische Kopplung zur Verknüpfung einzelner Komponenten eingesetzt werden kann. Kopplungen an Amino- und Thiolgruppen dienen als Beispiele für kovalente Kopplungen (D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, S. 363-, "The chemistry of the amino group" S. Patai, 1968, "The chemistry of the thiol group" S. Patai, 1974). Biotin-Streptavidin-Bindung oder Hybridisierung zwischen komplementären Nukleinsäuresträngen oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen stellen Beispiele für affine Kopplungen dar.

- 25 Die makromolekularen Marker bieten oft eine Vielfalt an Kopplungsmöglichkeiten. Ein makromolekularer Marker kann mehrere Kopplungsstellen für den Linker haben, beispielsweise mehrere Bindungsstellen für Biotin, wie es bei Streptavidin der Fall ist. Ein makromolekularer Marker kann auch mehrere Amino- bzw. Thiol-Gruppen aufweisen. Die Kern-Komponente des Markers kann mit unterschiedlicher Zahl von signalgebenden oder signalvermittelnden Einheiten modifiziert werden. Die genauen
- 30 Verhältnisse zwischen Marker-Einheiten können variieren. Beispiele für die Modifikation von Polymeren mit Farbstoffen sind bekannt (Huff et al. US Pat. 5661040, D. Brigati US Pat. 4687732). Falls Nukleinsäuren als makromolekulare Marker eingesetzt werden, so können diese unterschiedliche Abschnitte zur Kopplung anderer Makromoleküle besitzen. An einen makromolekularen Marker können andere
- 35 Makromoleküle gebunden werden, z.B. Enzyme.

Ein Nuk-Makromolekül kann makromolekulare Marker mit unterschiedlichen Detektionseigenschaften tragen, beispielsweise kann ein Nuk-Makromolekül sowohl

mehrere Farbstoffmoleküle als auch Stellen zur affinen Bindung (z.B. durch Hybridisierung) weiterer Makromoleküle tragen.

Die Kopplung zwischen der Nuk-Komponenten und der Linker-Komponenten erfolgt vorzugsweise kovalent. Viele Beispiele für eine kovalente Kopplung an Nukleotide oder deren Analoga sind bekannt (Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Short US Pat. 6579704, Odedra WO 0192284). Dabei kann die Kopplung beispielsweise an Phosphat, Amino-, Hydroxy- oder Mercaptogruppen erfolgen.

Oft kann die Linker-Komponente in mehreren Schritten aufgebaut werden. Beispielsweise wird im ersten Schritt ein kurzer Linker mit einer reaktiven Gruppe an das Nukleotid oder Nucleosid angekoppelt, z.B. Propargylamin-Linker an Pyrimidine Hobbs et al. US Patent 5.047.519 oder andere Linker z.B. Klevan US Pat. 4,828,979, Seela US pat. 6211158, US pat. 4804748, EP 0286028, Hanna M. Method in Enzymology 1996 v.274, S.403, Zhu et al. NAR 1994 v.22 S.3418, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, v. 278, S. 363-, Held et al. Nucleic acid research, 2002, v. 30 3857-, Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391, Short US Pat. 6579704, Ward et al. US Pat 4711955, Engelhardt et al. US Pat 5241060 Taing et al. US Pat 6811979, Odedra WO 0192284, Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642, Faulstich et al. DE 4418691, Phosphoroamidite (Glen Research Laboratories, <http://www.glenres.com/>, Trilink Biotechnologies, S. Agrawal "Protocols for oligonucleotide conjugation", Humana Press 1994, M.Gait "Oligonucleotide synthesis: a practical approach" IRL Press, 1990), Dissertation "Synthese basenmodifizierter Nukleosidtriphosphate und ihre enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA", Oliver Thum, Bonn 2002. Einige Verbindungen kann man käuflich erwerben, z.B. bei Trilink Biotechnologies, Eurogentec, Jena Bioscience.

Diese kurzen Linker dienen als Kopplungseinheiten L oder deren Teile, und sind ein Bestandteil der Linker-Komponente im fertigen Nuk-Makromolekül.

Im zweiten Schritt kann die Kopplung des Nukleotides oder Nucleosides mit einem kurzen Linker an das Linker-Polymer erfolgen. Polymere mit reaktiven funktionellen Gruppen können käuflich erworben werden (Fluka).

Nach der Kopplung des Nukleotids an das Polymer kann nun die Marker-Komponente als letzter Schritt gekoppelt werden.

Oft ist es vorteilhaft an ein Nukleosid einen kurzen Linker zu koppeln, dann, falls erforderlich, dieses modifizierte Nucleosid in ein Nucleosid-Triphosphat umzuwandeln

(Synthesen von Triphosphaten können beispielsweise in folgenden Literaturstellen gefunden werden: Held et al. Nucleosides, nucleotides & nucleic acids, 2003, v. 22, S. 391, Faulstich et al. DE 4418691, T. Kovacs, L. Ötvös, Tetrahedron Letters, Vol 29, 4525-4588 (1988) oder Dissertation "Synthese basenmodifizierter Nukleosidtriphosphate und ihre enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA", Oliver Thum, Bonn 2002).

Weitere Modifikationen können am Nukleosid-Triphosphat-Analog durchgeführt werden.

- 10 Vorstufen für modifizierte Nukleoside können sind beispielsweise bei Trilink Biotechnologies (San Diego, CA, USA) oder bei Chembiotech (Münster, Deutschland) kommerziell erhältlich.

- 15 Die Kopplung zwischen der Linker-Komponente und der Marker-Komponente kann beispielsweise zwischen reaktiven Gruppen an der Linker-Komponente und der Marker-Komponente erfolgen. Reagenzien für solche Kopplungen sind in "Chemistry of protein conjugation and cross-linking", S. Wang, 1993, ISBN 0-8493-5886-8, ausführlich dargestellt. Die Verfahren zur Handhabung und zur Kopplung von mehreren Makromolekülen sind für unterschiedliche Typen von Makromolekülen auch
- 20 in oben genannten Patenten dargestellt. Weitere Beispiele für Kopplungen an die und zwischen den Makromolekülen sind für Proteine in "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2; "Reactive dyes in protein and enzyme technology", D. Clonis, 1987, ISBN 0-333-34500-2; "Biophysical labeling methods in molecular biology" G. Likhtenshtein, 1993, 1993,
- 25 ISBN 0-521-43132-8; "Techniques in protein modification" R. Lundblad, 1995, ISBN 0-8493-2606-0; "Chemical reagents for protein modification" R. Lundblad, 1991, ISBN 0-8493-5097-2; für Nukleinsäuren in "Molecular Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5, für andere Polymerarten "Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X
- 30 beschrieben.

- Da die Marker-Komponente meistens viele Kopplungsstellen aufweist, können weitere Modifikationen an kompletten Nuk-Makromolekülen vorgenommen werden. Beispielsweise können überschüssige Amino-Gruppen abgeblockt werden oder durch
- 35 weiterführende Modifikationen verändert werden.

Je nach Einsatzgebiet und Reaktionsbedingungen, unter denen Nuk-Makromoleküle verwendet werden, können unterschiedliche chemische Bindungsarten zwischen

einzelnen Teilen der Makromoleküle von Vorteil sein. So eignen sich beispielsweise bei Verfahren mit Schritten mit höheren Temperaturen, wie z.B. bei Hybridisierung oder PCR, Nuk-Makromoleküle, die kovalente, thermostabile Bindungen zwischen einzelnen Teilen haben.

5

Nachfolgend sollen beispielhaft einige Möglichkeiten zur Synthese von Nuk-Makromolekülen dargestellt werden. Diese dienen nicht zur Einschränkung der möglichen Synthesewege und nicht zur Einschränkung der möglichen Nuk-Makromolekülstrukturen.

- 10 In folgenden Beispielen werden Nuk-Makromoleküle mit Polyethylenglycol (PEG) als Linker-Komponente angegeben. Beispiele für die Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in "Poly(ethylene glycol) : chemistry and biological applications", 1997 beschrieben. Im einzelnen können sehr unterschiedliche reaktive Gruppen zur Kopplung eingesetzt werden: N-succinimidyl carbonate (US Pat.. 5,281,698, US Pat.
- 15 5,468,478), Amine (Buckmann et al. Makromol. Chem. V.182, S.1379 (1981), Zalipsky et al. Eur. Polym. J. V.19, S. 1177 (1983)), succinimidyl propionate und succinimidyl butanoate (Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, 170-181, Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997; U.S. Pat. No. 5,672,662), Succinimidyl succinate (Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys.
- 20 v. 7, S.175 (1984), Joppich et al., Makromol. Chem. 1v. 80, S.1381 (1979), Benzotriazole carbonate (U.S. Pat. No. 5,650,234), Glycidylether (Pitha et al. Eur. J. Biochem. v. 94, S.11 (1979), Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. v.13, S. 354 (1991), Oxycarbonylimidazole (Beauchamp, et al., Anal. Biochem. v.131, S. 25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release v.1, S.251 (1985)), p-nitrophenyl carbonate (Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., v.11, S.141 (1985); and Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., v.27, S.45 (1991)), Aldehyde (Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. v.22, S. 341 (1984), US. Pat. 5824784, US. Pat. 5252714), Maleimide (Goodson et al. Bio/Technology v.8, S. 343 (1990), Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins v.2, S.29 (1984)), and Kogan, Synthetic Comm. v.22, S.2417
- 30 (1992)), Orthopyridyl-disulfide (Woghiren, et al. Bioconj. Chem. v. 4, S. 314 (1993)), Acrylol (Sawhney et al., Macromolecules, v. 26, S.581 (1993)), Vinylsulfone (U.S. Pat. No. 5,900,461). Weitere Beispiele für Kopplungen von PEG an andere Moleküle sind in Roberts et al. Adv. Drug Deliv. Reviews v. 54, S. 459 (2002), US Pat. 2003124086, US Pat. 2003143185, WO 03037385, US Pat. 6541543, US Pat. 2003158333, WO
- 35 0126692 zu finden.

Andere ähnliche Polymere können in ähnlicher Art gekoppelt werden. Beispiele für solche Polymere stellen andere Poly(Alkylenglykole), Copolymere aus Ethylenglykol

und Propyleneglykol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(saccharide), Poly(α -Hydroxy-Säuren), Poly(Acrylsäure), Poly(Vinylalkohol).

5 Die Aufreinigung der Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle erfolgt mit konventionellen Mitteln der Nukleotidchemie: beispielsweise mit Kieselgel-Chromatographie in einem Wasser-Ethanol-Gemisch, Ionenaustausch-Chromatographie in einem Salz-Gradienten und Reverse-Phase-Chromatographie in einem Wasser-Methanol-Gradienten. Für die Nukleotid-Aufreinigung optimierte
10 Chromatographie-Säulen werden z.B. von der Firma Sigma-Aldrich angeboten. Die Aufreinigung von makromolekularen Linker-Komponenten und Marker-Komponenten kann durch Ultrafiltration, Gel-Elektrophorese, Gelfiltration und Dialyse erfolgen, siehe "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2.

15

Die Masse der Nuk-Makromoleküle unterscheidet sich wesentlich von der Masse der Nukleotide. Aus diesem Grund ist es vorteilhaft, bei den Endreinigungsschritten die Ultrafiltration einzusetzen. Da für die Nuk-Makromoleküle nur eine durchschnittliche Masse berechnet wird, eignet sich Ultrafiltration auch als analytische Methode zu
20 Trennung von Syntheseprodukten.

Zur Charakterisierung der Nuk-Makromoleküle können unterschiedliche Methoden der makromolekularen Chemie angewendet werden, z.B. UV-Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzmessung, Massenspektroskopie, Fraktionierung,
25 Größenausschlußchromatographie, Ultrazentrifugation und elektrophoretische Techniken, wie IEF, denaturierende und nicht denaturierende Gel-Elektrophorese ("Makromoleküle, Chemische Struktur und Synthesen", Band 1, 4, H. Elias, 1999, ISBN 3-527-29872-X, "Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences", M. Aslam, 1996, ISBN 0-333-58375-2).

30 Die Messung von freien SH-Gruppen in einer Substanz erfolgte mit Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis (2-Nitrobenzolsäure), Riddles et al. Method in Enzym. 1983, V.91, S. 49.

Modifizierte Nukleinsäureketten

35 In einer Ausführung der Erfindung schließen Nukleinsäureketten Nuk-Komponenten der Nuk-Makromoleküle als Einheiten der Kette ein.

Synthese modifizierter Nukleinsäureketten

Als Monomer einer Polymer-Kette können Nuk-Makromoleküle in unterschiedlicher Art und Weise in die Kette eingebaut bzw. integriert werden. Generell kann man zwischen den chemischen und enzymatischen Schritten unterscheiden. Im weiteren werden
5 einige Beispiele der Synthese-Strategien vorgestellt.

Chemischer Einbau:

Beim chemischen Einbau kann ein komplettes Nuk-Makromolekül (d.h. Nuk-Linker-Marker) oder auch seine Bestandteile, z.B. nur Nuk-Komponente, oder Nuk-Linker-Komponente, in die Reaktion eingesetzt werden. Beispielsweise wird zunächst die Nuk-Komponente in die Nukleinsäurekette nach Regeln der Oligonukleotid-Synthese (MWG-Biotech, TriLink Biotechnologies, Glen Research Laboratories, , S. Agrawal "Protocols for oligonucleotide conjugation", Humana Press 1994, M.Gait "Oligonucleotide
10 synthesis: a practical approach" IRL Press, 1990) eingebaut, wobei ein Monomer der Kette eine zur Modifikation geeignete, geschützte reaktive Gruppe, beispielsweise eine geschützte Amino- oder Merkapto-Gruppe trägt. Nach der Entfernung der Schutzgruppe kann die Linker-Komponente und die Marker-Komponente an das Oligonukleotid gekoppelt werden.
15

Die Reinigung kann beispielsweise durch die Ultrafiltration oder durch Elektrophorese erfolgen.
20

Enzymatischer Einbau:

Ähnlich zum chemischen Einbau kann auch beim enzymatischen Einbau ein komplettes Nuk-Makromolekül (d.h. Nuk-Linker-Marker) oder auch seine Bestandteile, z.B. nur Nuk-Komponente, oder Nuk-Linker-Komponente, in die Reaktion eingesetzt werden.
25

Beispielsweise werden Nuk-Komponenten, die eine zur Kopplung einer Linker-Komponente geeignete reaktive Gruppe tragen, als Triphosphate in einer matrizen-abhängigen polymerase-gesteuerten Reaktion in die Nukleinsäurekette eingebaut.

Anschließend kann eine Linker- und Marker-Kopplung erfolgen.
30

In einer anderen Ausführungsform kann ein komplettes Nuk-Makromolekül in die Nukleinsäurekette eingebaut werden (s. Beispiel 34).

Modifizierte Nukleinsäureketten schließen Ribonucleinsäuren und auch Desoxy-Ribonukleinsäuren ein.
35

Der Anteil der Nuk-Makromoleküle und der nicht modifizierten Monomeren der Nukleinsäurekette liegt vorzugsweise im Verhältnis zwischen 1:5 und 1:20, 1:20 und

1:100, 1:50 und 1:1000, 1:500 und 1:10000. Auch mehrere Nuk-Makromoleküle können pro eine Nukleinsäurekette eingebaut sein. In einer Ausführungsform schließt eine Nukleinsäurekette nur ein Nuk-Makromolekül ein, in einer weiteren Ausführungsform liegt die Zahl der Nuk-Makromoleküle pro eine Nukleinsäurekette in folgenden Bereichen: 2 bis 20, 5 bis 50, 10 bis 100.

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 5'-Ende der Nukleinsäurekette integriert.

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül an das 3'-Ende der Nukleinsäurekette integriert.

In einer Ausführungsform ist ein Nuk-Makromolekül im Inneren der Nukleinsäurekette integriert, wobei der Abstand vom am nächsten liegenden Kettenende in folgenden Bereichen liegt (Zahl der Monomeren der Kette bis zum nächsten Kettenende): 1 bis 2, 2 bis 4, 4 bis 8, 8 bis 15, 15 bis 30, 30 bis 100, 100 bis 500.

3. Synthesen von modifizierten Nukleotiden

Trennungsmethoden:

Dünnschichtchromatographie, DC:

- 5 Analytisch: „DC-Alufolien 20 x 20 cm Kieselgel 60 F 254“ (VWR), beschichtet mit Fluoreszenzindikator. Visualisierung erfolgt mittels UV-Licht. Laufmittel Ethanol-Wasser-Gemisch (70:30) (Laufmittel, LM 1) oder Ethanol-Wasser-Gemisch (90:10) (LM 2).

Präparativ: Kieselgel-Glasplatten mit Sammelschicht (VWR). LM 1 oder LM 2.

10

Umkehrphasen-Chromatographie (RP-Chromatographie), RP-18:

C-18 Material (Fluka), Säulenvolumen 10ml, Wasser-Methanol-Gradient. Fraktionen je 1ml wurden gesammelt und mit UV-Vis-Spektrometer analysiert. Fraktionen mit ähnlichen Spektren wurden vereinigt und lyophilisiert.

15

HPLC-Säulen mit ähnlichem Material können verwendet werden (Sigma).

Ionenaustausch-Chromatographie

DEAE-Zellulose (VWR), Gradient NH_4HCO_3 20mmol/l - 1mol/l, Fraktionen wurden unter UV/Vis -Kontrolle gesammelt und auf Grundlage gleicher Spektren vereinigt.

20

Die Affinitätsisolierung von Nuk-Makromolekülen kann beispielsweise eingesetzt werden, wenn Nuk-Makromoleküle Oligonukleotide Bestandteil der Marker-Komponente sind. Durch die Hybridisierung an eine komplementäre, auf einer festen Phase fixierte Nukleinsäure können sie selektiv isoliert werden.

25

Die Bestimmung der Ausbeuten für farbstoffmarkierte Produkte erfolgte an UV-Vis-Spektrometer.

30

Die Vollständigkeit der Kopplung an Streptavidin wurde durch eine Kontrolltitration mit einem Biotin-Farbstoff (Biotin-4-Fluoreszein, Sigma) 100 $\mu\text{mol/l}$ in 50 mmol/l Borat, pH 8, 5 min bei RT durchgeführt. Bei einer kompletten Besetzung von Biotin-Bindungsstellen an Streptavidin während der Synthese erfolgt keine Markierung von Streptavidin. Bei einer nicht ausreichenden Reaktion erfolgt eine Bindung an SA. Analyse mit UV-Vis.

35

Material:

Diamono PEG 10.000 (Diamino-Polyethylenglycol 10.000, Sigma), dUTP-AA (dUTP-Allylamine, Jena-Bioscience), dCTP-PA (dCTP-Propargyl-Amin, Jena Bioscience), dATP-PA (7-(3-Amino-1-propynyl)-2'-deoxy-7-deazaadenosin-5'-Triphosphat) (Auftragssynthese von JenaBioscience), dGTP-PA (7-(3-Amino-1-propynyl)-2'-deoxy-7-deazaguanosin-5'-Triphosphat, (Auftragssynthese von JenaBioscience), TTP (Thymidin-Triphosphat, kann auch als dTTP gekennzeichnet werden, Sigma), 3'-Amino-TTP (3'-Amino-3'-deoxy-Thymidin-Triphosphat, Trilink Biotechnologies), PDTP (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure, Fluka), 7-(3-Phthalimido-1-propynyl)-2'-desoxy-7-deazaguanosin und 7-(3-Phthalimido-1-propynyl)-2'-desoxy-7-deazaadenosin (Chembiotech), PDTP-NHS (3-(2-Pyridinyl-dithio)-propionsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), Cy3- NHS (Cy3- N-hydroxysuccinimidyl-ester, Amersham Bioscience), MEA (Mercaptoethylamine, Sigma), DTT (1,4-Dithio-DL-threit, Sigma), CA (Cystamine, Sigma), TCEP - (Tris-(2-carboxyethyl)phosphine, Sigma), DTBP (3,3'-Dithio-Bis-Propionsäure, Fluka), Biotin-NHS (Biotin-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma). J-Ac (Iodoacetat, Sigma), Iodacetamid (Sigma), TEAE (Tris-(2-Aminoethyl)amine, Sigma), Maleimido-ES-NHS (Maleimido-Essigsäure-N-hydroxysuccinimidyl-ester, Sigma), EDA (Ethylendiamin, Sigma), CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol, Sigma), EDC N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-Ethylenecarbodiimide (Sigma), NH2-PEG-Biotin (30 Atome), Sigma), PAS 100 kDa (Polyacrylsäure, 100 kDa, Aldrich), NHS-PEG-Maleimid, 3.400 Da, Biotin-PEG-NHS, 5.000 Da, Fmoc-PEG-NHS, 3.400 Da, mPEG-SPA 5.000 Da, mPEG-SPA 20.000 Da (Nektar), Diamin-PEG, 6.000 Da (Fluka), Fmoc-NH-(PEG)₂-COOH (20 Atome), (Novabiochem, Merck Biosciences, Darmstadt), Fmoc-Amino-PEG-acid (n=11) (BioVectra) Aminodextran 70000, Aminodextran 500000 (Molecular Probes), 3'-Biotin-dT31 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 31 Thymidinmonophosphaten, mit einem Biotin-Molekül am 3'-Ende (MWG-Biotech), 3'-SH-Oligo-dT30 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 30 Thymidinmonophosphaten, mit einer Merkaptogruppe am 3'-Ende (MWG-Biotech), 3'-Amino-Oligo-dT31-5'-Cy3 ein Oligonucleotid mit einer Sequenz aus 31 Thymidinmonophosphaten, mit einer über einen Linker aus 6 Atomen am 3'-Ende gekoppelten Amino-Gruppe und einem Cy3-Farbstoff, gekoppelt am 5'-Ende (MWG-Biotech), SA (Streptavidin, Roche), SA-Cy2 (mit Cy2-Farbstoff modifiziertes Streptavidin, Amersham Bioscience). QDot (Qdot 605 Streptavidin Conjugat, Quantum Dot). Poly-Lysin 1000 - 2000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 1000 -2000 Da, Fluka), Poly-Lysin 10.000 - 20.000 (Poly-L-lysin-hydrobromid 10.000 -20.000 Da, Fluka).

Lieferanten und Firmenverzeichnis:

Aldrich	- s. Sigma
Amersham	- Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland

	Chembiotech	- Chembiotech, Münster, Deutschland
	Fluka	- s. Sigma
	Jena-Bioscience	- Jena-Bioscience, Jena, Deutschland
	Molecular Probes	- Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande
5	MWG	- MWG-Biotech, Ebersberg bei München, Deutschland,
	Nektar	- Nektar Molecular engineering, früher <i>Shearwater Corporation</i> , <i>Huntsville, AL, USA</i>
	Quantum Dot	- Quantum Dot Hayward, CA, USA
	Roche	- Roche, Mannheim, Deutschland
10	Sigma	- Sigma-Aldrich-Fluka, Taufkirchen, Deutschland,
	Trilink	- Trilink Biotechnologies Inc. San Diego, CA, USA,

Lösungsmittel wurden, wenn nötig, absolutiert verwendet (Fluka) oder nach Standardverfahren getrocknet. Bei Lösungsmittelgemischen beziehen sich die angegebenen Mischungsverhältnisse auf die eingesetzten Volumina (v/v).

Synthese einzelner Komponenten:

20 Beispiel 1:

dUTP-AA-PDTP, Fig 10A.

20 mg dUTP-AA wurden in 1ml Wasser gelöst und der pH-Wert mit NaOH auf 8.5 eingestellt. Zur dUTP-AA - Lösung wurde PDTP-NHS 60mg in 0.5 ml Methanol, tropfenweise unter Rühren zugegeben. Reaktion wurde 2 h bei 40°C durchgeführt.

25 DC-Kontrolle: dUTP-AA-PDTP (in LM 1 Rf 0.45).

Die Trennung von überschüssigem PDTP-NHS und PDTP erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Das Produkt, dUTP-AA-PDTP, und dUTP-AA bleiben auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingengt.

30 Dieses dUTP-Analog trägt nun eine Disulfid-Bindung, die in einer Thiolaustauschreaktion mit anderen Thiolen reagieren kann und eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung darstellt.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 7-Deaza-Aminopropargyl-Desoxy-Guanosin-Triphosphat und 7-Deaza-Aminopropargyl Desoxy-Adenosin-triphosphate, 5-Amino-Propargyl-Desoxy-Uridin-Triphosphate, 5-Amino-Allyl-Desoxy-Uridin-Triphosphate, 5-Amino-Propargyl-Desoxy-Cytidin-Triphosphate können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl

Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

Beispiel 2:

5 dCTP-PA-PDTP, Fig. 10B

Die Synthese wurde wie für dUTP-AA-PDTP, Beispiel 1, beschrieben durchgeführt.

Beispiel 3:

dUTP-AA-Propionat-SH, Fig. 15

10 Zu 200 µl 40 mmol/l Lösung von dUTP-AA-PDTP wurde 1 ml TCEP-Lösung 250 mmol/l, pH 8, eingestellt mit NaOH, zugegeben und 10 min bei RT gerührt.

Die Trennung der Nukleotide von anderen Reagenzien erfolgte auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2. Produkt, dUTP-AA-Propionat-SH, bleibt auf der Startlinie. Die Nukleotide wurden von der Platte mit Wasser eluiert und eingengt.

15 Dieses dUTP-Analog trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 4:

Biotin-PEG-Ethyl-SH, Fig. 16

20 Zu 200 µl wässriger CA-Lösung (100 mmol/l), pH 8.5, eingestellt mit NaOH, wurden 10 mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde 200 µl TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration auf 3.000 MWCO (Molecular weight cut off) von anderen Reagenzien getrennt. Ausbeute 35%.

25

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Ein weiteres Beispiel für die Einführung von SS-Bindung bzw. Kopplung einer Mercaptogruppe an PEG ist hier angeführt:

30

10 mg Amino-PEG-Biotin (30 Atome) wurden in 280 µl 50 mM Borat-Puffer aufgelöst und pH auf 9 eingestellt. Zu dieser Lösung wurden zwei Äquivalente von PDTP-NHS in 100 µl DMF zugegeben. Nach 1 Stunde bei RT wurde der Überschuss von PDTP-NHS mit Überschuss von NH_4HCO_3 abreagiert. Das Produkt stellt folgende Verbindung dar:

35

Biotin-PEG-PDTP dar.

Dieses Produkt kann durch Thiolaustausch an ein weiteres Molekül gekoppelt werden. Durch Spaltung der SS-Bindung kann eine freie SH-Gruppe bereitgestellt werden.

Beispiel 5:

Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin),

Zu 1 ml wässriger CA-Lösung (2 mmol/l), pH 8.5 mit NaOH eingestellt, wurden 100mg Biotin-PEG-NHS zugegeben und bei RT 18 Stunden gerührt. Das Produkt wurde durch
5 Ultrafiltration auf 10.000 MWCO von anderen Reagenzien getrennt und lyophilisiert. Ausbeute 13%.

Das Produkt besitzt eine Disulfid-Verbindung, die an Thiolaustauschreaktionen teilnehmen kann.

10 Beispiel 6:

MEA-Cy3, Fig. 17

Zu 1ml wässriger CA-Lösung, 200 mmol/l, pH 8.5 eingestellt mit NaOH, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 10 mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde 1 ml TCEP-Lösung (0.5
15 mol/l), pH 8.0 eingestellt mit NaOH, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 93%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann,
20 beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 7:

Cy3-TEAE, Fig. 18

Zu 1ml wässriger TEAE-Lösung, 300 mmol/l, pH 8.5 mit NaOH eingestellt, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 5mmol/l betrug . Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt und auf
25 0.5ml eingengt, Ausbeute 82%, UV-Vis.

Das Produkt hat zwei Aminogruppen, die leicht mit anderen Reagentien modifiziert werden können und neue Funktionalitäten an den Farbstoff koppeln können.

30

Beispiel 8:

Cy3-TEAE-Propionat-SH, Fig. 19

Zu 300µl wässriger Cy3-TEAE, 2mmol/l, pH 7.5, wurden langsam 30µl einer frisch
35 bereiteten methanolischen Lösung von PDTP-NHS, 30mmol/l, zugegeben. Der Ablauf der Reaktion wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Als Reaktionsprodukte erscheinen auf DC Substanzen (LM 1) mit Rf. 0.55 (Cy3-TEAE-PDTP) und 0.95 (Cy3-TEAE-(PDTP)₂). Nach Ablauf von 1 h wurde die Reaktion gestoppt und die Produkte auf DC mit LM 1 getrennt. Die Substanz mit Rf. 0.55 wurde isoliert, eingengt und in 200µl Wasser

aufgelöst. Zu dieser Lösung wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, Cy3-TEAE-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 26%, UV-Vis.

- 5 Das Produkt trägt einerseits eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung, andererseits eine Amino-Gruppe, die mit anderen Reagentien reagieren kann.

Beispiel 9:

- 10 TEAE-(Cy3)₂, Fig. 20

Zu 1ml wässriger TEAE-Lösung, 2 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 4mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 10 min bei RT gerührt. Das Produkt (Rf. 0.45) wurde auf präparat. Kieselgel DC mit LM 1 von anderen Reaktionsprodukten getrennt, mit 50mM Borat-Puffer, pH 9, eluiert, danach
15 auf RP-18 gesammelt und anschließend mit 50% Et-OH eluiert und auf 0.5ml eingengt, Ausbeute 22%, UV-Vis.

Beispiel 10, Fig. 21

Poly-Lysin-(Cy3)_n, n = 10-15, Poly-Lysin 10.000-20.000

- 20 Zu 1ml wässriger Poly-Lysin-Lösung, 1 mmol/l, wurde Cy3-NHS zugegeben, bis die Konzentration des Cy3-Farbstoffs 18mmol/l betrug. Die Reaktion wurde 40 min bei RT gerührt. Die Trennung von modifiziertem Poly-lysin von Farbstoffresten erfolgte durch Ultrafiltration, 3000 MWCO. Bestimmung der durchschnittlichen Zahl Cy3-Moleküle
erfolgte über UV-Vis-Spektrometer.

25

Poly-Lysin stellt ein Beispiel für ein Kern-Komponente dar, an die mehrere Marker-Einheiten, beispielsweise Farbstoffe gekoppelt werden können. In diesem Experiment wurde die Verteilung von Cy3-Molekülen in Poly-Lysin-Population rechnerisch ermittelt, aus den bekannten Größenunterschieden der Poly-Lysin-Moleküle und der
30 mittleren ermittelten Zahl von Cy3-Moleküle.

Beispiel 11,

TEAE-(Cy3)₂-PDTP und TEAE-(Cy3)₂-Propionat-SH, Fig 22:

- 35 Zu 200µl TEAE-(Cy3)₂, 1mmol/l wurden 10mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde durch DC, LM 1, kontrolliert. Nach 1 h wurde eine fast quantitative Umsetzung von TEAE-(Cy3)₂ (Rf. 0.45) zu TEAE-(Cy3)₂-PDTP, (Rf. 0.85) festgestellt. Der Ansatz wurde in zwei gleiche Teile geteilt.

Das Produkt, TEAE-(Cy3)2-PDTP, aus dem ersten Teil wurde auf RP-18 getrennt und lyophilisiert. Ausbeute 82%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

5

Zum zweiten Teil wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zum Ansatz zugegeben und noch 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, TEAE-(Cy3)2-Propionat-SH, wurde auf RP-18 getrennt, Ausbeute 68%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

10

Beispiel 12, Fig 23

(HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, (n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000)

Zu 200µl Poly-Lysin-(Cy3)n, 1mmol/l wurden 10mg, PDTP-NHS zugegeben und 1 Stunde bei RT gerührt. Das Produkt, (PDTP)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, wurde durch Ultrafiltration von den PDTP-Resten abgetrennt und anschließend in 100µl Wasser gelöst. Danach wurde 0.1ml TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zum Ansatz zugegeben und weitere 10 min bei RT gerührt. Das Produkt, (HS-Propionat)m-Poly-Lysin-(Cy3)n, wurde mit 3.000 MWCO von den niedermolekularen Bestandteilen getrennt.

Das Produkt trägt mehrere reaktive SH-Gruppen, die leicht modifiziert werden können, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

15

20

Beispiel 13:

TTP-3'-O-Propionat-SH, Fig 24A,

Die Synthese von 3'-modifizierten Nukleotiden erfolgt nach Gottikh et al. Tetrahedron, 1970, v. 26, 4419-, Schäfer et al. Method in Enzymology, 1986, v. 126, S. 682-.

25

30

35

DTBP, 210 mg, wurden in 1ml DMF gelöst. Zu dieser Lösung wurde CDI 320mg zugegeben und 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 10µl Methanol zugegeben und nach weiteren 10 min wurden 100µl dieser Lösung, 1mol/l, zu 300µl wässriger 100mmol/l-Lösung von TTP, pH 8.5 eingestellt mit NaOH, zugegeben und ca. 4 h bei RT kräftig gerührt. Die Nukleotide wurden durch Präzipitation mit Ethanol isoliert und dann in 300µl Wasser gelöst. Anschließend wurde 200µl TCEP-Lösung (0.5 mol/l), pH 8.0, zugegeben und nach 10 min bei RT erfolgt die wiederholte Präzipitation der Nukleotide. Die Trennung der modifizierten Nukleotide von den nicht modifizierten ist auf dieser Stufe nicht notwendig. Ausbeute 13%, UV-Vis.

Das Produkt trägt eine reaktive SH-Gruppe, die leicht modifiziert werden kann, beispielsweise unter Ausbildung von Disulfid-Bindung.

Beispiel 14:

TTP-3'-Amino-PDTP, Fig 24B

- 5 Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA, Beispiel 1, beschrieben: Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP, 100µl, 10mmol/l Lösung, pH 8 und PDTP-NHS eingesetzt. Ausbeute 19%, UV-Vis.

10 Das Produkt trägt eine Disulfidbindung, die leicht an einer Thiolaustauschreaktion teilnehmen kann und somit an andere Verbindungen gekoppelt werden kann.

Auch andere, am 3'-Ende mit einer Bindungsstelle, z.B. einem kurzen Linker, modifizierte Nukleotide können eingesetzt werden. Synthesen sind dargestellt beispielsweise in Metzker et al. Nucleic acid Research 1994, V.22, S. 4259, Canard et al. Gene, 1994, V. 148, 1, Hovinen et al. J. Chem. Soc. Perk. Trans. 1994V.1, S. 211, Herrlein et al. Helvetica Chimica Acta, 1994, V. 77, S. 586, Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V. 278, S. 363, Canard US. Pat. 5798210, Kwiatkowski US Pat. 6255475, Kwiatkowski WO 01/25247, Parce WO 0050642, Faulstich DE 4418691.

- 20 Weitere Beispiele für basenmodifizierte Nukleotide, die als Nuk-Komponente verwendet werden können, sind in Balasubramanian WO 03048387 beschrieben. Noch weitere Beispiele für Nukleotid-Analoga sind in "Nucleotide Analogs" Scheit, 1980, ISBN 0-471-04854-2, "Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry", Kisakürek 2000, "Anti-HIV Nucleosides" Mitsuya, 1997, "Nucleoside Analogs in cancer therapy", Cheson, 1997 angegeben. Ein Fachmann sollte erkennen, dass auch andere Nukleoside und Nukleotide verwendet werden können.

Beispiele für Kopplung von Linker-Komponenten und Marker-Komponenten an Nuk-Komponenten

30 **Beispiel 15:**

dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Fig. 25

- Zu 100µl, 10mmol/l MEA-Cy3 in 50mM Borat, pH 9.5, wurde 50µl 30mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50mM Borat, pH 9.5 zugegeben. Nach 1 Stunde wurde das dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3) durch Dünnschicht-Chromatographie, LM 1, Rf. 0.6, von MEA-Cy3, Rf. 0.9, getrennt. Anschließend wurde dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3) auf RP-18 von dUTP-AA-PDTP getrennt. Ausbeute 67%, UV-Vis.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität trägt. Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit nur einem niedermolekularen Marker auftreten.

5 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase) als Substrat akzeptiert, s. Beispiel 34A.

Beispiel 16:

dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)₂, Fig. 26

10 dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)₂ wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-(Cy3), Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde TEAE-(Cy3)₂-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3 verwendet. Ausbeuten 43%, UV-Vis.

15 Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und zwei niedermolekulare Marker-Funktionalitäten trägt. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

Beispiel 17:

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3, Fig. 27

20 dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 wurde ähnlich wie dUTP-AA-SS-MEA-Cy3, Beispiel 15, synthetisiert, dabei wurde Cy3-TEAE-Propionat-SH anstatt von MEA-Cy3 verwendet. Ausbeute 37%, UV-Vis.

25 Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität. Der Linker an der Base hat eine freie Aminogruppe, die modifiziert werden kann. Das Nukleotid wird von Polymerasen als Substrat akzeptiert.

Beispiel 18:

(dUTP-AA-SS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n

30

Edukte:

dUTP-AA-PDTP

(HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000

35 Zu 50µl einer Lösung mit dUTP-AA-PDTP, 20mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.0, wurde 20µl (HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, ca. 1mmol/l, in Wasser, gegeben und 18 h bei RT gerührt. Das Produkt wurde durch Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotids führt zum Verlust der Substrateigenschaften.

Beispiel 19:

dUTP-AA-PEG-Biotin, Fig. 28

Zu 100µl wässriger Lösung dUTP-AA, 50mmol/l, pH 8.0, wurden 10mg Biotin-PEG-NHS gegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde das nicht umgesetzte Nukleotid durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO, abgetrennt und das Produkt der Reaktion, das dUTP-AA-PEG-Biotin, mehrmals mit Wasser gewaschen.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Biotin kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnden Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist.

Das Produkt der Reaktion ist eine Zwischenstufe eines Nuk-Makromoleküls. Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP (Fig. 29) können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

In einer ähnlichen Weise können auch andere Polymere, z.B. PEG-Derivate, als Linker gekoppelt werden. Ein Beispiel dafür stellt dATP-PA-PEG-NH₂.

Zu 100µl wässriger Lösung 7-Deaza-7-Aminopropargyl-dATP (hergestellt aus 7-(3-Phthalimido-1-propynyl)-2'-desoxy-7-deazaadenosin von Jena Bioscience), 50mmol/l, pH 8.0, wurden 10mg Fmoc-PEG-NHS (Fmoc-geschützter NH₂-PEG-NHS) gegeben und bei 40°C 18 Stunden gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 11 erhöht und die Reaktionsmischung weitere 2 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das nicht umgesetzte Nukleotid durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO, abgetrennt und das Produkt der Reaktion, das dATP-PA-PEG-NH₂, mehrmals mit Wasser gewaschen.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. NH₂-Gruppe dient als Kopplungseinheit T für die Marker-Komponente. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Polyacryl-säurederivate, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Nukleotid-Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Beispiel 20:

TTP-3'-Amino-PEG-Biotin,

Die Synthese erfolgte ähnlich wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19. Als Edukte wurden 3'-Amino-3'-Deoxy-TTP und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Einheit (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. An das Biotin können makromolekulare signaltragende Streptavidin-Moleküle gekoppelt werden.

Auch andere Nukleotid-Analoga mit einer Amino-Gruppe in der 3'-Position können in ähnlicher Weise gekoppelt werden.

Beispiel 21:

dCTP-PA-PEG-Maleimid,

Die Synthese erfolgte wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19, beschrieben. Als Edukte wurden dCTP-PA und Maleimid-PEG-NHS eingesetzt.

Diese Verbindung hat eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Kopplungseinheit T an diesem Linker ist die Maleimid-Gruppe. An Maleimid-Funktionalität können makromolekulare signaltragende Moleküle gekoppelt werden, die eine oder mehrere SH-Gruppen tragen.

Maleimid-Gruppe kann auch als eine niedermolekulare Marker-Einheit mit signalvermittelnden Funktion betrachtet werden, die an den langen Linker gekoppelt ist. An diese Marker-Komponente können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen.

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

Beispiel 22:

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-(Cy3)-PEG-Biotin, Fig. 30

Die Synthese erfolgte ähnlich wie für dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben. Als Edukte wurden dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 und Biotin-PEG-NHS eingesetzt. Die Trennung vom nicht abreagierten dUTP-Analog erfolgte durch Ultrafiltration, 3.000 MWCO.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität, einen Farbstoff, einen makromolekularen Linker und eine niedermolekulare Marker-Funktionalität (Biotin), die eine signalvermittelnde Funktion hat. Biotin kann auch als eine Kopplungseinheit T des Linkers betrachtet werden.

An die Kopplungseinheit T (in diesem Beispiel Biotin) können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen.

Der Farbstoff dient als sterisch anspruchsvolle Gruppe, die den enzymatischen Einbau von nur einem Nuk-Makromolekül in den wachsenden Strang durch die Polymrase zulässt. Die Eigenschaften solcher Nukleotide sind detailliert in Tcherkassov WO 02088382 beschrieben.

Beispiel 23:

dUTP-AA-SS-PEG-Biotin, Fig. 31 A,

Zu 100µl, 10mmol/l Biotin-PEG-Ethyl-SH in 50mM Borat, pH 9.5, wurde 50µl 30mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50mM Borat, pH 9.5 zugegeben. Reaktion wurde 18 Stunden bei RT gerührt. Die Trennung erfolgt ähnlich wie für die Synthese von dUTP-AA-PEG-Biotin, Beispiel 19 beschrieben.

Diese Verbindung trägt eine Nukleotid-Funktionalität und einen makromolekularen Linker. Biotin dient als Kopplungseinheit T. An diese Kopplungseinheit T können makromolekulare Strukturen gekoppelt werden, z.B. Streptavidin, ohne dass die Substrateigenschaften dieser Analoga verloren gehen. Dieses Nuk-Makromolekül dient als Substrat für Polymerasen. Über Streptavidin können auch weitere makromoleküle, beispielsweise Enzyme oder Nukleinsäurenge koppelt werden. Biotin kann auch als signalvermittelnde niedermolekulare Marker-Einheit bezeichnet werden.

Die Linker-Komponente kann zusammen mit der Marker-Komponente von der Nuk-Komponente unter milden Bedingungen abgespalten werden. Dies kann beispielsweise

von Vorteil sein, wenn eine Sequenzierung durch Synthese (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Quake WO0132930, Kartalov WO02072892) durchgeführt wird, wobei nach jedem Detektionsschritt eine Entfernung der Marker notwendig ist.

5

Ein weiteres Beispiel für die Nuk-Makromoleküle mit einer unter milden Bedingungen spaltbaren Gruppe: dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin (Fig. 31 B).

Für diese Reaktion wurde das dUTP-AA-PDTP zunächst auf RP-HPLC in Wasser-Methanol-Gradient gereinigt.

10

Zu 10 µl einer 50 mmol/l Lösung von dUTP-AA-PDTP in Wasser wurden 20 µl einer 100 mmol/l Lösung von TCEP, pH 8, zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT 10 min durchgeführt. Das Produkt der Reaktion, das dUTP-AA-Propionat-SH, wurde von anderen Reagenzien auf präparativen Kieselgel-Platten, LM 2, getrennt. Das Produkt, dUTP-AA-Propionat-SH, bleibt auf der Startlinie. Es wurde von der Platte mit Wasser

15

eluiert, eingengt und in 50 µl 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, aufgelöst.

Zu dieser Lösung wurden 50 µl einer frisch angesetzten 2 % wässrigen Lösung von Biotin-PEG-NHS zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei RT 30 min lang. Anschließend wurde das Produkt der Reaktion, das dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin, durch Ultrafiltration mit MWCO 3000 von niedermolekularen Reaktionskomponenten abgetrennt, fünf mal mit 0,5 ml Wasser gewaschen und in einem Volumen von 50 µl aufgelöst.

20

Das auf diese Weise erhaltene dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin kann von DNA-Polymerasen, beispielsweise Klenow-Fragment Exo minus oder Taq-Polymerase, in den wachsenden Strang der Nukleinsäuren eingebaut werden.

25

An das Biotin können über das Straptavidin weitere Marker-Komponenten gekoppelt werden.

30

Das dUTP-AA-Propionat-S-CO-PEG-Biotin enthält eine unter milden Bedingungen spaltbare Gruppe, so dass der Linker mit dem Farbstoff von dem Nukleotid abgespalten werden kann. Dies ist beispielsweise in Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese vom besonderen Interesse (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Quake WO0132930, Kartalov WO02072892).

35

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-

Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

5 **Beispiel 24:**

TTP-O-Propionat-SS-PEG-Biotin,

Zur 100µl Lösung von TTP-O-Propionat-SH, 10mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurden 100µl einer Lösung von Bis-Dithio-(Ethyl-PEG-Biotin), 0.5mmol/l, in Wasser gegeben und 24 Stunden bei RT gerührt. Die Aufreinigung erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO ähnlich wie in Beispiel 19.

Beispiele für die Kopplung von Aminogruppen an die Phosphatreste der Nukleotide sind in D. Jameson et al. Methods in Enzymology 1997, V. 278, 363 angegeben. An diese Amino-Gruppe kann eine Linker-Komponente gekoppelt werden. Beispiele für Kopplungen von Linkern an Phosphat-Gruppen von Nukleotiden sind in US Patent 5.981.507 dargestellt. An einen solchen Linker können weitere makromolekulare Linker gekoppelt werden, die einen niedermolekularen Marker oder eine niedermolekulare Kopplungseinheit oder einen makromolekularen Marker tragen.

In einer Ausführungsform wird makromolekularer Linker an die Phosphat-Gruppen angefügt, die an der 5'-Position der Ribose gekoppelt sind. Die Kopplung erfolgt vorzugsweise an der Gamma-Phosphat-Gruppe der Nukleotide, wobei sowohl Ribonukleotide als auch 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Dideoxynukleotide eingesetzt werden können.

In einer anderen Ausführungsform erfolgt die Kopplung des makromolekularen Linkers an die 3'-Phosphat-Gruppe eines 5'-Nukleosid-Triphosphat.

Kopplungen an Marker-Komponenten

Beispiel 25, :

(dUTP-16-Biotin)4-SA,

Zu 200µl einer Lösung von Biotin-16-dUTP 200µmol/l in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, wurden 200µl einer Streptavidin-Lösung, 1mg/ml, in 50mM Tris-HCl, pH 8.0, zugegeben. Nach 1 Stunde bei RT wurde das (dUTP-16-Biotin)4-SA vom nicht umgesetzten Biotin-16-dUTP durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, abgetrennt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten trägt.

Es kann stellvertretend für konventionell modifizierte Nukleotide mit einem makromolekularen Markern betrachtet werden.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation führt zum Verlust der Substrateigenschaften, s. Beispiel 34B.

- 5 Eigenschaften der Biotin-Streptavidin-Bindung sind z.B. in Gonzalez et al. Journal Biol. Chem. 1997, v. 272, S. 11288 beschrieben.

Beispiel 26:

(dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2,

- 10 Die Kopplung von dUTP-16-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt.

Die Verbindung dient als Äquivalent zu Verbindung aus Beispiel 25, wobei zur Visualisierung Streptavidin fluoreszent markiert ist.

- 15 **Beispiel 27:**

dCTP-PA-SS-Oligo-dT30,

- Die Synthese erfolgte wie bei dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 beschrieben. Zu dCTP-PA-PDTP, 100µl, 20mmol/l, wurde Oligo-dT30-3'-SH (MWG-Biotech) zugegeben, Endkonzentration 200µmol/l, und 18 Std bei RT, pH 9, gerührt. Die Aufreinigung
20 erfolgte durch Ultrafiltration mit 3.000 MWCO.

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat nicht akzeptiert. Die Modifikation des Nukleotidteils führt zu Aufhebung der Substrateigenschaften.

25

Beispiel 28:

(dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 und (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA, Fig. 32

- Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 bzw. an SA wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt. Zu 200µl 1µg/µl Streptavidin wurden 10µl einer
30 Lösung von dUTP-AA-PEG-Biotin, ca. 1mmol/l, gegeben, und bei RT 1 h gerührt.

Danach wurde das Produkt durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, von dem nicht gekoppelten dUTP-AA-PEG-Biotin abgetrennt und das Produkt 2 mal mit Wasser gewaschen.

- 35 Ein Teil des gewonnenen (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 wurde mit Cy3-NHS modifiziert: 50µl (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2 wurden in 50mmol/l Borat, pH 8.5, aufgelöst, bis zur Konzentration von 1.4µg/µl, und anschließend mit Cy3-NHS versetzt. Endkonzentration von Cy3 betrug 10mmol/l. Die Reaktion wurde 1 Std. bei

RT durchgeführt. Das Produkt, (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Cy2/Cy3, wurde durch Ultrafiltration mit 30.000 MWCO getrennt.

Dadurch wurde ein Nuk-Makromolekül hergestellt, dass sehr wenige freie Amino-Gruppen am Marker-Teil aufweist.

5

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt.

Das Produkt kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden.

- 10 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34,35.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s.Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

15

Beispiel 29:

(dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-Alkalische Phosphatase, Fig.33, und (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA-QDot, Fig. 34,

- 20 Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-AP bzw. QDot wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt.

Im Falle von QDot werden Nuk-Linker-Teile an der Oberfläche der QDots angeordnet. Es wurden Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente mit einem Enzym bzw. Q-Dots trägt.

- 25 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s.Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

30 **Beispiel 30:**

(dUTP-AA-PEG-Biotin)2-(dT31-TEG-Biotin)2- SA-Cy2, , Fig. 35A

Die Kopplung von dUTP-AA-PEG-Biotin an SA-Cy2 wurde wie für (dUTP-16-Biotin)4-SA beschrieben durchgeführt:

- 35 Zu 100µl einer Streptavidin-Cy2-Lösung, 20µmol/l (1.2mg/ml), in Tris-HCl, 50mmol/l, pH 8, wurden 80µl 80µmol/l dT31-3'-TEG-Biotin (MWG Biotech) zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. (TEG ist ein kurzer Linker zwischen Biotin und dT31). Danach wurden 100µl einer Lösung dUTP-AA-PEG-Biotin 50µmol/l in 50mM Tris-HCl, pH 8.0,

zugegeben. Nach 10 min bei RT wurde (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-TEG-Biotin)₂-SA-Cy2 durch Ultrafiltration, 50.000 MWCO, gereinigt.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT31). Das Oligo-dT31 besteht aus Nukleosidmonophosphaten, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 35B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999).

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

Dieses Derivat kann beispielsweise an Poly-dA oder poly-A (z.B. mit durchschnittlicher Länge 260NT, Amersham Bioscience) durch Hybridisierung gekoppelt werden. Sowohl ein einziges als auch mehrere (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-Biotin)₂-SA-Cy2 Moleküle können an ein Poly-dA-Molekül gekoppelt werden, s.auch Fig. 5. Das Verhältnis wird durch die Konzentrationsverhältnisse bestimmt. Auch andere Oligonukleotide, beispielsweise markiert mit Farbstoffen, können zusammen mit (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-Biotin)₂-SA-Cy2 an denselben Strang der Poly-dA oder poly-A gekoppelt werden, wobei die Verhältnisse zwischen einzelnen Molekülen variabel sind. Dadurch ist es möglich, ein polyfunktionales Nuk-Makromolekül herzustellen. Der große Vorteil eines solchen Nuk-Makromoleküls besteht in einer leicht spaltbaren makromolekularen Markierung: die an die poly-dA bzw. poly-A Stränge hybridisierten markierten Oligonukleotide können durch Denaturierung abgelöst werden. Durch die Wahl der Länge der markierten Oligonukleotide, kann die T_m dieser Oligonukleotide für die jeweiligen Anforderungen der reversiblen Markierung angepasst werden. Die Regeln zur T_m-Berechnung sind dem Fachmann bekannt ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, band 1-3, 2001). Beispielsweise können dT₂₅-Oligonukleotide, markiert mit einem Cy3-Molekül an Poly-dA gekoppelt werden. Durch den Einsatz von RNA, z.B. poly-A, zur Bindung mehrerer (dUTP-AA-PEG-Biotin)₂-(dT31-Biotin)₂-SA Moleküle, kann die Spaltung durch eine RNase erfolgen.

Da Streptavidin 4 Bindungsstellen für Biotin hat, entsteht ein Gemisch von Nuk-Makromolekülen, bei dem 4 Bindungsstellen unterschiedlich besetzt sind. Dieses Gemisch kann mit unterschiedlichen Mitteln getrennt werden. Eine der Möglichkeit

besteht in Isolierung von Nuk-Makromolekülen, die mindestens ein Oligo-dT31 tragen, beispielsweise durch eine Absorbtion an einem Anionenaustauscher (z.B. einer DEAE-Cellulose-Säule). Auf Gel-Elektrophorese eignet sich zur Trennung einzelner Derivate.

5 Auch längere Nukleinsäureketten, die ein Biotin-Molekül tragen, beispielsweise poly-dA-Biotin, hergestellt beispielsweise durch eine terminale Kopplung von ddUTP-18-Biotin durch eine TdT-abhängige Reaktion ("Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001), können in ähnlicher Weise an das Streptavidin gekoppelt werden, so dass Moleküle mit einer durchschnittlichen Zusammensetzung von $(\text{dUTP-AA-PEG-Biotin})_N\text{-SA}$ entstehen. Sowohl einzelsträngige als auch
10 doppelsträngige Nukleinsäureketten können gekoppelt werden. Die Länge der gekoppelten Nukleinsäureketten kann zwischen 10 und 100, 100 und 1000 Nukleotiden liegen.

15 Die hybridisierten Oligonukleotide, die einen Farbstoff tragen, können an den Poly-dA Strang auch kovalent durch Cross-Linker gebunden werden.

Auch andere Verbindungen, die einen langen Linker haben und ein Biotin-Molekül tragen, s.Beispiele 20, 22, 23, 24, können ähnlich in der Synthese eingesetzt werden.

20

Beispiel 31A:

$(\text{dUTP-AA-SS-PEG-Biotin})_4\text{-SA}$ und $(\text{dUTP-AA-SS-PEG-Biotin})_4\text{-SA-Cy2}$, Fig. 36

Die Kopplung von dUTP-AA-SS-PEG-Biotin an SA bzw. an SA-Cy2 wurde wie für $(\text{dUTP-AA-PEG-Biotin})_4\text{-SA}$ beschrieben durchgeführt. Als Edukte wurden Streptavidin
25 und dUTP-AA-SS-PEG-Biotin eingesetzt.

25

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Die Linker-Komponente und die Marker-Komponente können von der Nuk-Komponente
30 unter milden Bedingungen abgespalten werden.

30

Das Produkt kann stellvertretend für Nuk-Makromoleküle betrachtet werden, die eine unter milden Bedingungen spaltbare Verbindung in der Linker-Komponente tragen.

35 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert s. Beispiel 34.

Beispiel 31B

(dGTP-PA-SS-PEG-Biotin)4-SA

200 µl 50 mM Lösung an Streptavidin in 50 mM Borat-Puffer, pH 9, wurden mit 5 Äquivalenten von Biotin-PEG-PDTP (PEG-Linker 30 Atome; Synthese s. Beispiel 4) 10 Minuten inkubiert. Streptavidin-(Biotin-PEG-PDTP)4 wurde durch Ultrafiltration an 30kDa MWCO von niedermolekularen Komponenten durch mehrmaliges Waschen mit Borat-Puffer getrennt. Zu 200 µl 50 mM Streptavidin-(Biotin-PEG-PDTP)4 Lösung in Borat-Puffer wurden mit 100 µl 10 mM Lösung von TCEP, pH 8, zugegeben. Nach 30 min wurde Streptavidin-(Biotin-PEG-R-SH)4 erneut durch Ultrafiltration an 30kDa MWCO von niedermolekularen Komponenten durch mehrmaliges Waschen mit Borat-Puffer getrennt.

dGTP-PA wurde mit PDTP-NHS modifiziert, ähnlich wie im Beispiel 1 dargestellt, das Produkt ist dGTP-PA-PDTP. 50 µl einer 100 mM Lösung von dGTP-PA-PDTP in 50 mM Borat-Puffer, pH 9, wurden zu 200 µl 50 µM Streptavidin-(Biotin-PEG-R-SH)4 in 50 mM Borat Puffer zugegeben. Nach 30 min RT wurden makromolekulare Produkte u.a. (dGTP-PA-SS-PEG-Biotin)4-SA durch Ultrafiltration an 30kDa MWCO von niedermolekularen Komponenten durch mehrmaliges Waschen mit Borat-Puffer getrennt.

Das resultierende Produkt (dGTP-PA-SS-PEG-Biotin)4-SA hat einen Linker von 42 Atomen zwischen Nuk-Komponente und dem Biotin. Dieses Nuk-Makromolekül hat eine spaltbare SS-Bindung in seinem Linker und kann von Klenow Fragment in eine Nukleinsäurekette eingebaut werden.

Beispiel 32:

dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, Fig. 37A

Zu 100µl einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurde 100µl einer Lösung von 3'-SH-Oligo-dT30, 200µmol/l, in Wasser zugegeben und 48 Std. bei RT gerührt. Das Produkt wurde mittels präparativer Gel-Elektrophorese, 12% Polyacrylamid-Gel, gereinigt.

Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT30). Das Oligo-dT30 besteht aus Nukleotiden, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 37B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999.)

Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

5 Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Allylamino-dUTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-
10 Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

Durch Zugabe von Poly-dA oder Poly-A können mehrere dCTP-PA-PEG-Maleimid-S-Oligo-dT30, z.B. 10-20, zu einem Nuk-Makromolekül gekoppelt werden. Dabei entsteht ein Nuk-Makromolekül mit linear angeordneten Nuk-Linker-Komponenten
15 (Fig. 37 C).

Beispiel 33 :

(dCTP-PA-PEG-Maleimid-S)_n-Poly-Lysin-(Cy3)_m,

Edukte: dCTP-PA-PEG-Maleimid

20 (HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, n = 10-15, m 3-9, Poly-Lysin 10.000-20.000

Zu 100µl einer Lösung mit dCTP-PA-PEG-Maleimid, 5mmol/l, in 50mM Borat-Puffer, pH 9.5, wurde 20µl einer Lösung von (HS-Propionat)_m-Poly-Lysin-(Cy3)_n, ca. 1mmol/l, in Wasser, gegeben und 18 Std. bei 40°C gerührt. Das Produkt wurde durch
25 Ultrafiltration, 30.000 MWCO, gereinigt.

Es wurde eine Verbindung erhalten, die eine Nukleotid-Funktionalität, einen langen makromolekularen Linker und eine makromolekulare Marker-Komponente trägt. Pro Nuk-Makromolekül sind mehrere Nuk-Komponenten gekoppelt. Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als
30 Substrat akzeptiert.

Weitere Kombinationen von Nuk-Komponenten, Linker-Komponenten und Marker-Komponenten sind dem Fachmann naheliegend.

Vergleich von Substrateigenschaften einiger Vertreter von Nuk-Makromolekülen mit konventionell modifizierten Nukleotiden.

Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle gegenüber Polymerasen und Terminale deoxy-Nucleotidyl-Transferase (TdT) wurden mit den Eigenschaften der konventionell modifizierten Nukleotide in einer Markierungsreaktion verglichen. Allgemeine Prinzipien von Markierungsreaktionen findet man in "Molecular-Cloning", J. Sambrook, Band 1-3, 2001, ISBN 0-87969-576-5.

Beispiel 34: Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen oder konventionell modifizierten Nukleotiden gegenüber Polymerasen

Dieses Beispiel soll nicht zur Einschränkung der möglichen Markierungsreaktionen dienen, sondern lediglich Unterschiede in den Substrateigenschaften verdeutlichen.

In den Reaktionen wurden sowohl selbst synthetisierte als auch kommerziell erhältliche modifizierte Nukleotide dUTP-Cy3 (Amersham) und dUTP-16-Biotin (Roche) verwendet. Nicht modifizierte dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) wurden bei der Firma Roth erworben.

Als Matrizen dienten sowohl kurze Oligonucleotide als auch poly-dA. Primer und Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech synthetisiert.

Reaktionen wurden in 20mmol/l Tris-Puffer, pH 8.5, 5mmol/l $MgCl_2$, 10% Glycerin, durchgeführt. Die Konzentrationen der Primer betrugen 1 μ mol/l, die der Oligonukleotide 1 μ mol/l und die Konzentration der poly-dA, 0.1 μ g/ μ l (für die Konzentrationsverhältnisse an der festen Phase s.u.). Als Polymerase wurde Klenow Exo minus 1Unit /100 μ l (Amersham) verwendet. Die Konzentrationen von Nukleotiden betrugen 20 μ mol/l für konventionell modifizierte Nukleotide und 5 μ mol/l für Nuk-Makromoleküle. Nicht modifizierte Nukleotide wurden in Konzentrationen von 50 μ mol/l eingesetzt.

Zunächst wurden Primer an die jeweilige Matrize hybridisiert: Das Reaktionsgemisch ohne Polymerase wurde auf 75°C erhitzt und über 5 min auf 37°C abgekühlt. Danach wurde die Polymerase zugegeben. Alle Reaktionen wurden über 1 h bei 37°C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration von 10mmol/l) gestoppt.

Zu einigen Ansätzen wurde nach dem Stop der Reaktion Streptavidin, bis zu Endkonzentration von 1mg/ml, zugegeben und der Ansatz weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Dadurch können bereits eingebaute Nukleotide, die ein Biotin tragen, mit Streptavidin reagieren und somit Streptavidin und Oligonukleotid verbinden. Diese Experimente eignen sich als Kontrolle für die Laufeigenschaften von modifizierten Primern.

Zu entsprechend gekennzeichneten Ansätzen wurde Mercaptoethanol (bis 20mmol/l Endkonzentration) zugegeben und der jeweilige Ansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Mercaptoethanol wurde bei einigen Ansätzen während, bei anderen Ansätzen auch nach der Reaktion zugegeben.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels denaturierender Gel-Elektrophorese, 20% Polyacrylamid-Gel, 50mmol/l Tris-HCl, pH 8.7, wie in "Gel electrophoresis of nucleic Acids", Ed. D. Rickwood, 1990, dargestellt. Zur Denaturierung der Proben wurde anstatt von 7M Urea eine erhöhte Temperatur bei der Gelelektrophorese eingesetzt (60°C). Die Elektrophorese wurde in Biorad-Gelkammern (Protean 3) durchgeführt, 200V, ca. 1h. Die Visualisierung erfolgte auf einer UV-Vis Gel-Dokumentationsanlage (Biorad).

Beispiel 34A, Fig. 38**Darstellung des Einbaus und Spaltung von einem konventionell modifizierten Nukleotid (dUTP-AA-SS-MEA-Cy3)****5 Sequenzen:**

Primer:

Primer-T7-20-5'-Cy3: 5'-Cy3-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Matrize:

Oligonukleotid

10 Oligo 1: 5'-AGTTTTAGTTTTACCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

Die Primer-Bindungsstelle ist unterstrichen

Legende zu Figur 38:

Spuren 1-6:

- 15** 1) nur PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1
2) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP+ Polymerase
3) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dCTP-Cy3 + dATP + dGTP + dTTP+ Polymerase
4) PrimerT7-20-Cy3 + Oligo 1+ dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 + Polymerase
5) nach 1 Std. wurde zu einem Aliquot von Ansatz 4 Mercaptoethanol zugegeben und
20 weitere 10 min inkubiert, es erfolgt eine Abspaltung der Markierung
6) nach 10 min wurde zum Aliquot von Ansatz 5 dATP, dGTP zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert

Wie man sieht, wird dUTP-AA-SS-MEA-Cy3 von der Polymerase eingebaut (Spur 4). Der
25 Farbstoff kann vom Primer abgespalten werden (Spur 5) (man sieht eine Verschiebung der Bande, die durch die geringere Größe von Oligonukleotid zu begründen ist). Anschließend können weitere Nukleotide eingebaut werden (Spur 6).

Ein ähnlich durchgeführter Reaktionsansatz mit dUTP-AA-SS-TEAE-(Cy3)₂ führte nicht zum Einbau des Nukleotid-Analogs in den Primer.

5 Dieses Beispiel zeigt, dass sogar geringfügige Veränderungen in der Analog-Struktur, wie z.B. Verdopplung der Zahl der Farbstoffe, die an ein Nukleotid gekoppelt sind, zu Veränderung in Substrateigenschaften der Nukleotide führen können.

Beispiel 34B, Fig. 39

10 **Vergleich von Substrateigenschaften eines konventionell modifizierten Nukleotid mit einem makromolekularen Marker und einem Nuk-Makromolekül**

Sequenzen:

Primer:

Primer-dT₃₅-5'-Cy3 (dT35-Cy3): 5' Cy3-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

15 Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA, (dUTP-16-Biotin)₄-SA, dUTP-16-Biotin

Legende zu Figur 39:

20 Spuren 1-9:

1) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3

2) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

3) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

4) (dUTP-16-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase

25 5) (dUTP-16-Biotin)₄-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA

6) (dUTP-16-Biotin)₄-SA-Cy3 + dT35-Cy3 + Poly-dA

Im Kontroll-Ansatz, Spuren 7-9:

7) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C
danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration, danach + Streptavidin 10 min 37°C

8) dUTP-16-Biotin + dT35-Cy3 + Poly-dA + Polymerase, Inkubation 1 std. 37°C
danach + EDTA bis 10mmol/l Endkonzentration,

5 9) Leiter: T-7-20-Cy3, dT35-Cy3, dT40-Cy3, dT50-Cy3

Ein Nuk-Makromolekül, (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, wird in den Primer eingebaut
(Spur 2). Der markierte Primer hat nach dem Einbau eines Nuk-Makromoleküls eine
stark veränderte elektrophoretische Beweglichkeit. Bloße Anwesenheit von Nuk-
10 Makromolekülen hat keinen Einfluß auf den Primer (Spur 3).

Ein konventionell modifiziertes Nukleotid, (dUTP-16-Biotin)4-SA, mit einem
makromolekularen Marker wird nicht in den Primer eingebaut (Spur 4). Trotz der
Anwesenheit der Polymerase in Reaktion 4 (Spur 4) lassen sich keine Unterschiede
15 zwischen Spur 4 und Spur 5 feststellen.

Spur 6 zeigt die Position des konventionell modifizierten Nukleotids mit einem
makromolekularen Marker, (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy3, die obere Bande, und die
Position des markierten Primers (die untere Bande).

20 Spur 7 zeigt das Ergebnis des Einbaus von dUTP-16-Biotin mit einer nachfolgenden
Reaktion mit dem Streptavidin: die mit Biotin markierten Primer reagieren mit
Streptavidin und verändern ihre Laufeigenschaften. Die nicht modifizierten Primer
behalten ihre elektrophoretischen Eigenschaften bei.

25 Spur 8 zeigt das Ergebnis der Einbaureaktion eines konventionell modifizierten
Nukleotides, dUTP-16-Biotin. Man sieht eine verbreitete Primer-Bande, die durch den
Einbau von dUTP-16-Biotin in den Primer zustande kommt. Die Verlängerung von
Primer ist eingeschränkt, da dUTP-16-Biotin nicht unbegrenzt nacheinander eingebaut
30 werden kann, durchschnittlich wird ca. 3 dUTP-Analoga eingebaut, so dass die Länge
von Primer durchschnittlich auf 38 NT ansteigt. Erwartungsgemäß führt der Einbau
von konventionell modifizierten Nukleotiden mit einem niedermolekularen Marker nicht
zu einer starken Veränderung in der elektrophoretischen Mobilität der Primer.

35 In diesem Experiment wurden Eigenschaften der Nuk-Makromoleküle, (dUTP-AA-SS-
PEG-Biotin)4-SA, mit denen der Konventionell modifizierten Nukleotide verglichen.
Man sieht deutlich, dass die Kopplung eines makromolekularen Markers an ein
kommerziell erworbenen dUTP-16-Biotin zum vollständigen Verlust der

Substrateigenschaften der Nukleotide führt. Spuren 7 und 8 zeigen allerdings, dass die Polymerase sehr wohl in der Lage ist, dUTP-16-Biotin ohne makromolekularen Marker in den Primer einzubauen. Die Koppung von Streptavidin an das Biotin nach der Einbaureaktion führt zu genannten Veränderungen in Primer-Eigenaschaften.

5

Im Gegensatz dazu können Nuk-Makromoleküle (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA in den Primer ohne Schwierigkeiten durch die Polymerasen eingebaut werden. Das Auftreten von mehreren Banden im Gel führen die Erfinder auf einen mehrfachen Einbau von Nuk-Makromolekülen in den Primer (3 Banden) zurück.

10

Beispiel 34C, Fig. 40:

Vergleich von Substrateigenschaften von Nuk-Makromolekülen, Einbau-Reaktion in der Lösung und an einer festen Phase

Sequenzen:

Primer: (dT35-Cy3)

Primer-dT-35-5'-Cy3: 5'-Cy3-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'

Matrize:

Poly-dA (Amersham), durchschnittlich 270 Nukleotide lang.

20

Oligo-dA50-3'-TEG-Biotin (MWG-Biotech)

Nukleotide: (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA, (dU-AA-PEG-Biotin)4-SA

Streptavidin-polystyrene Particle, 2.17µ, Spherotech Inc,

Vorbereitung von Streptavidin-polystyren Kügelchen (feste Phase).

25 Drei Ansätze wurden in gleicher Weise vorbereitet.

Je 0.5 ml der Lösung mit Kügelchen (im Hersteller-Puffer) wurde kurz zentrifugiert und Kügelchen-Pellet wurde in 100µl Einbaupuffer (20 mmol/l Tris, pH 8.5, 5mmol/l MgCl₂) resuspendiert. Anschließend wurden 100µl Oligo-dA50-3'-TEG-Biotin Konz. 50µmol/l zugegeben und 1 h bei RT gerührt. In dieser Zeit binden die Oligo-dA-Moleküle an die Kügelchen. Anschließend wurden Kügelchen kurz abzentrifugiert und drei mal im Einbaupuffer gewaschen. Endvolumen der festen Phase beträgt je 100µl. Diese Menge an Oligo-dA50-feste-Phase kann Primer-dT-35-Cy3 in 2µmol/l hybridisieren.

30

Die Hybridisierung von Primer-dT-35-Cy3 erfolgte bei 40°C 10 min, mit anschließender
35 Abkühlung auf RT innerhalb von 10 min. Alle anderen Schritte wurden gleich bei allen Ansätzen durchgeführt.

Legende zu Figur 40:

Spuren 1-10:

1) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,

Reaktionen in der Flüssigphase:

- 5 2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase
3) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA
4) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 h
bei 37°C, dann + EDTA
5) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA+ Polymerase, Inkubation 1 h
10 bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu 200mmol/l
(Endkonzentration), für 30 min.
6) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Poly-dA + EDTA

Reaktionen an der Festphase:

- 7) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase+ Polymerase,
15 Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA
8) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase + Polymerase,
Inkubation 1 h bei 37°C, dann + EDTA, anschließend + Mercaptoethanol bis zu
200mmol/l (Endkonzentration), für 30 min.
9) (dUTP-AA-SS-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + Oligo-dA50-feste-Phase, vor
20 Elektrophorese + EDTA

10) Leiter: dT35-Cy3, dT40-Cy3,

Man sieht deutlich das Ergebnis der Einbaureaktion von Nuk-Makromolekülen in Spuren 2,4,5,7,8. Sowohl in der Lösung, als auch an der festen Phase läuft die enzymatische Markierungsreaktion gut ab.

Nach Zugabe von Mercaptoethanol zu mit EDTA gestoppten Reaktionen erfolgt die
5 Abspaltung von Linker-Komponenten mit dem gebundenen Streptavidin von den Primern. Dies führt zu Wiederherstellung der elektrophoretischen Eigenschaften der Primer. Die Verschiebung der Primer-banden in Spuren 5 und 8 ist durch multiplen Einbau von Nuk-Makromolekülen in die Primer zu begründen. Tatsächlich, liegen die Primer-Banden nach
10 der Spaltung in Höhe von dT40-Cy3 (s. Leiter). Dies bedeutet, dass bis zu 5 Nuk-Makromolekülen während der Reaktion in die Primer eingebaut wurden.

Beispiel 35, Fig. 41:

Substrateigenschaften der Nuk-Makromoleküle und konventionell modifizierter Nukleotide gegenüber Terminaler Transferase (TdT).

15

Die Reaktion wurde nach Angaben des Kit-Herstellers (Roche) durchgeführt: Auf jeweils 50µl Volumen wurden zugegeben: 10µl 5x Reaktionspuffer, 1µl TdT (25Units), 5µl 25mmol/l CoCl₂. Die Primer- und Nukleotid-Konzentrationen waren wie bei den Polymerase-Reaktionen. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C durchgeführt.

20 Primer: Primer-dT₃₅-5'-Cy3 (dT35-Cy3), Primer-dT₃₅ (dT35)

Legende zu Figur 41:

1) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + TdT

2) (dUTP-AA-PEG-Biotin)4-SA + dT35-Cy3

25 3) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35 + TdT

- 4) dUTP-Cy3 (Amersham)+ dT35
- 5) dUTP-16-Biotin (Roche) + dT35-Cy3 + TdT;
- 6) Ansatz 5; nach dem Stop + Streptavidin
- 7) Streptavidin -Cy2
- 5 8) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3 + TdT
- 9) (dUTP-16-Biotin)4-SA + dT35-Cy3
- 10) (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2

10 In der Spur 1 sieht man deutlich 2 Banden, die Bande in der Mitte entspricht dem dT35-Cy3, die obere Bande entspricht dem Reaktionsprodukt: Nuk-Makromolekül wurde in dT35 durch TdT eingebaut. Spur 2 dient als Negativkontrolle. In Spur 3 sieht man das Ergebnis der Markierung des dT35 mit dem konventionellen Nukleotid dUTP-Cy3, Spur 4 ist die Negativkontrolle. In Spur 5 ist das Ergebnis der Kopplung von dUTP-16-Biotin an die dT35-Cy3 schlecht zu erkennen. In Spur 6 sieht man allerdings

15 eine schwache Bande im oberen Bereich, die dem Ergebnis der Reaktion des mit dUTP-16-Biotin modifizierten Primers mit Streptavidin entspricht. Spur 7 zeigt die Position des modifizierten Streptavidins. In Spur 8 und 9 sieht man nur eine Bande in der Mitte des Gels, die dem dT35-Cy3 entspricht, im oberen Gel-bereich ist keine Bande zu sehen, was eindeutig darauf deutet, dass konventionell modifizierten Nukleotide mit

20 einem makromolekularen Marker von TdT nicht eingebaut werden. Spur 10 zeigt die Position des (dUTP-16-Biotin)4-SA-Cy2 im Gel.

Beispiel 36:

dUTP-AA-SS-PEG-Cy3, Fig. 42 A

25 Zunächst wurde SH-PEG-Cy3 hergestellt. Zu 200 µl einer 10 mmol/l Lösung von Diamin-PEG (6kDa, Fluka) in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, wurde Cy3-NHS (Amersham-Bioscience) bis zu Endkonzentration von 15 mmol/l zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT 30 min lang durchgeführt. Anschließend wurde NH₂-PEG-Cy3 (Fig. 42 B) von Farbstoffresten durch Ultrafiltration mit MWCO 3000 abgetrennt, 3 mal

30 mit 1 ml 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, gewaschen und in einem Volumen von 200 µl 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 8, aufgelöst.

Zu dieser Lösung wurde PDTP-NHS bis zu Endkonzentration von 50 mmol/l zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT 30 min lang durchgeführt. Anschließend wurden 50 µl einer 1 mol/l Lösung von NH₄HCO₃, pH 8, zugegeben und das

35 Reaktionsgemisch wurde weitere 60 min inkubiert. Zur Reduktion der Disulfidbindungen wurden 100 µl einer 1 mol/l TCEP-Lösung, pH 8, zum Reaktionsgemisch zugegeben. Nach 5 min bei RT wurde das Produkt der Reaktion, das SH-PEG-Cy3, von den niedermolekularen Komponenten durch Ultrafiltration mit MWCO

3000 abgetrennt, 5 mal mit 1 ml 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7, gewaschen und in einem Volumen von 200 µl 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7, aufgelöst. Unmittelbar vor Kopplung des Nukleotid-Teils wurde der pH-Wert auf 9.0 mit 1 mol/l NaOH eingestellt.

5 **Kopplung des SH-PEG-Cy3 an den Nukleotid-Teil:**

Zu 100 µl 20 mmol/l dUTP-AA-PDTP in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wurden 100 µl der Lösung mit SH-PEG-Cy3 in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 9.0, zugegeben. Reaktion wurde bei RT über 30 min durchgeführt. Das Produkt der Reaktion wurde durch Ultrafiltration mit MWCO 3000 von niedermolekularen Komponenten abgetrennt, 5 mal mit 1 ml 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 7, gewaschen und in einem Volumen von 200 µl 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7, aufgelöst.

Das auf diese Weise erhaltene dUTP-AA-SS-PEG-Cy3 kann von DNA-Polymerasen, beispielsweise Klenow-Fragment Exo-minus oder Taq-Polymerase, in den wachsenden Strang der Nukleinsäuren eingebaut werden.

Das dUTP-AA-SS-PEG-Cy3 enthält eine unter milden Bedingungen spaltbare Gruppe, so dass der Linker mit dem Farbstoff von dem Nukleotid abgespalten werden kann. Dies ist beispielsweise in Verfahren der Sequenzierung durch die Synthese vom besonderen Interesse (Balasubramanian WO 03048387, Tcherkassov WO 02088382, Quake WO0132930, Kartalov WO02072892).

Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 5-Propargylamino-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14.

30 **Beispiel 37:**

dUTP-R-CO-S-PEG-Biotin Fig. 43

Das dUTP-R-COOCH₃ (Fig. 44) wurde analog zur Vorschrift (Heike A. Held, Abhijit Roychowdhury, and Steven A. Benner, Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, Vol 22,391-404 (2003)) synthetisiert. Die Triphosphatsynthese erfolgte nach T. Kovacs, L. Ötvös, Tetrahedron Letters, Vol 29, 4525-4588 (1988)).

500 mg (1.41 mmol) 5-Iod-2'-Deoxyuridin wurden bei Raumtemperatur in 10 ml wasserfreiem DMF unter Stickstoffatmosphäre suspendiert und 10 min. gerührt. Nun gibt man 160 mg (0.14 mmol) Tetrakis(triphenylphosphin)-palladium(0) zu. Nach

weiteren 10 min gibt man nacheinander 400 µl Triethylamin, 480 mg (4.28 mmol) Pent-1-insäuremethylester und 55 mg (0.29 mmol) Kupfer-(I)-iodid zu. Nach 15 h wird die Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer eingengt und das erhaltene rote Öl chromatographisch an Kieselgel gereinigt (Dichlormethan : Methanol = 20 : 1).

5 Man erhält 400 mg (84%) Produkt. Nach Triphosphorylierung wurde dUTP-R-COOCH₃ erhalten.

10 In ähnlicher Weise können auch andere Basen wie Cytosin, Adenosin und Guanosin-Derivaten mit dem Pent-1-insäuremethylester modifiziert werden (Dissertation "Synthese basenmodifizierter Nukleosidtriphosphate und ihre enzymatische Polymerisation zu funktionalisierter DNA", Oliver Thum, Bonn 2002).

Weitere Modifikation erfolgt am dUTP-R-COOCH₃:

15 Zu 100 µl einer 50 mmol/l Lösung der dUTP-R-COOCH₃ in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wird 100 µl einer 1 mol/l Lösung des Merkптоethanolamins, pH 9, zugegeben und bei 40°C 3 h gerührt. Das Produkt der Reaktion, das dUTP-R-CO-S-CH₂-CH₂-NH₂ (Fig. 45), wird vom überschüssigen Merkптоethanolamin auf DEAE-Cellulose im Borat-Puffer 10 mmol/l abgetrennt und mit 0,3 mol/l NaCl von der Säule eluiert.

20

Dieses Nukleotid hat eine unter milden Bedingungen spaltbare Thioester-Gruppe und kann an der Aminogruppe am Linker modifiziert werden.

An diese Amino-Gruppe können weitere Modifikationen vorgenommen werden.

25 Beispielsweise kann an sie ein Farbstoff gekoppelt werden:

Synthese von dUTP-R-CO-S-CH₂-CH₂-NH-R-Cy3 (Fig. 46)

30 Zu 100 µl einer 10 mmol/l Lösung des dUTP-R-CO-S-CH₂-CH₂-NH₂ in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wurde Cy3-NHS bis zu Konzentration von 15 mmol/l zugegeben. Die Reaktion erfolgte bei RT über 30 min. Anschließend wurde das mit Cy3-modifizierte Nukleotid auf Kieselgel-Platte und RP-18 Säule gereinigt, ähnlich wie in Beispiel 15 dargestellt.

Ein solches Nukleotid kann als reversibler Terminator in einem Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden (Tcherkassov WO 02088382). Die Spaltung der Thioester-Verbindung kann beispielsweise durch Zugabe von 100 mmol/l Merkптоethanol in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, erfolgen.

35

An die Aminogruppe des dUTP-R-CO-S-CH₂-CH₂-NH₂ kann auch ein langer Linker mit einem niedermolekularen Marker gekoppelt werden, ähnlich wie im Beispiel 19. Das

erhaltene dUTP-R-CO-S-CH₂-CH₂-NH-PEG-Biotin kann als Zwischenprodukt für ein Nuk-Makromolekül dienen.

Beispiel 38:

dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 (Fig. 47),

Dieses Derivat kann aus dUTP-AA-SS-Propionat-TEAE-Cy3 (s. Beispiel 17) durch Modifikation der Aminogruppe im Linker mit einem mPEG-SPA, z.B. 5.000 Da, erhalten werden. Die Modifikationsbedingungen sind ähnlich wie im Beispiel 19. Dieses Molekül besitzt einen langen Linker und kann durch die erfindungsgemäße Methode zur schnellen Reinigung der modifizierten Nukleotide vor ihrem Einsatz in den Markierungsreaktionen eingesetzt werden. Für eine Trennung von markierten von unmarkierten Nukleotiden kann in diesem Beispiel ein Filter mit MWCO von 3000 verwendet werden.

Beispiel 39:

Synthese von dUTP-AA-SS-R-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 (Fig. 48)

Herstellung von SH-R-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 (Fig. 49):

Zu 200 µl einer 100 µmol/l Lösung von 3'-Amino-Oligo-dT₃₁-Cy3 im 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9, wurde NHS-PEG-Maleimid zugegeben, bis die Konzentration von 20% (w/v) erreicht wurde. Das Gemisch wurde 2 h bei 40°C kräftig gerührt. Die Trennung des Maleimid-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 vom Überschuss an PEG-Derivat erfolgte auf DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie: Das Reaktionsgemisch wurde in 10 mmol/l Borat, pH 9, auf die Säule aufgetragen, und mit 20 Säulenvolumina 50 mmol/l Borat, pH 9, gewaschen. Elution von Maleimid-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 von der Säule erfolgte mit 1 M NaCl in 50 mmol/l Borat, pH 9. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration (MWCO 3000) zunächst eingeeengt und das Produkt wurde in 20 mmol/l Borat-Puffer, pH 9.0, umgepuffert. Das Maleimid-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 wurde vom Oligo-dT₃₁-Cy3 auf präparativem 15% Polyacrylgel durch die Elektrophorese getrennt, aus dem Gel isoliert und in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9.0, aufgelöst. Ausbeute: 55%.

Zu Lösung mit Maleimid-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 wurde DTT bis zu Konzentration 0,5 mol/l zugegeben und das Gemisch wurde 16 h bei RT gerührt. Durch Reaktion von DTT mit Maleimid entsteht SH-R-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3. Diese Substanz wurde auf DEAE-Säule vom DTT-Überschuss abgetrennt: Das Reaktionsgemisch wurde in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, auf die Säule aufgetragen, und mit 20 Säulenvolumina 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0 gewaschen. Elution von SH-R-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 von der Säule erfolgte mit 1 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0. Das Eluat wurde mit Ultrafiltration (MWCO 3000) zunächst eingeeengt und das Produkt, SH-R-PEG-Oligo-

dT₃₁-Cy3, wurde in 50 mmol/l Borat-Puffer, pH 9.0 umgepuffert. Die Konzentration von SH-R-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 betrug 100 µmol/l.

5 Zu dieser Lösung wurden 50 Äquivalente an dUTP-AA-PDTP (synthetisiert wie im Beispiel 1) zugegeben. Nach 3 h bei RT erfolgte Trennung auf DEAE-Cellulose: Das Gemisch wurde in 50 mmol/l Na-Acetat-Puffer, pH 6.0, auf die Säule aufgetragen, und mit 20 Säulenvolumina 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, gewaschen. Elution von dUTP-AA-PDTP erfolgte mit 0,3 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, Elution von dUTP-AA-SS-R-PEG-Oligo-dT₃₁-Cy3 erfolgte mit 0,8 mol/l NaCl in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0. Das Eluat wurde mit Ultrafiltration (MWCO 3000) zunächst eingengt und das Produkt wurde in 50 mmol/l Na-Acetat, pH 6.0, umgepuffert.

15 Die Substanz trägt eine Nukleosid-Triphosphat-Funktionalität und eine makromolekulare Marker-Funktionalitäten (Oligo-dT₃₁). Das Oligo-dT₃₁ besteht aus Nukleosid-Monophosphaten, die allerdings an der enzymatischen Reaktion nicht teilnehmen und nur eine signalvermittelnde Funktion haben. An ein solches Oligonukleotid können komplementäre Nukleinsäuren hybridisiert werden, die eine signalgebende Funktion haben (Fig. 37B). (allgemeine Regeln zur Hybridisierung von Nukleinsäuren sind dem Fachmann bekannt, Anderson "Nucleic Acid Hybridization", 1999.).

20 Diese Verbindung wird von Polymerasen (z.B. Klenow-Exo minus Polymerase und Terminaler Transferase) als Substrat akzeptiert.

25 In ähnlicher Weise können auch andere Oligonukleotide an das dUTP-Derivat gekoppelt werden. In einer Ausführungsform der Erfindung können andere Homopolymer-Oligonukleotide, wie z.B. Poly-dC, poly-dG oder poly-dU oder poly-dA. In einer anderen Ausführungsform können auch Oligonukleotide mit spezifischen Sequenzen eingesetzt werden. Durch die spezifische Sequenzen von Oligonukleotiden können Nukleinsäureketten sequenzspezifisch hybridisiert werden. Zur Synthese von Nuk-Makromolekülen können auch Oligonukleotide eingesetzt werden, die Haarnadel-Strukturen (Stemloops) beinhalten.

35 In diesem Beispiel trägt das Oligonukleotid eine am 3'-Ende über einen Linker gekoppelte Amino-Gruppe, die als Kopplungsstelle für Maleimid-PEG-NHS auftritt, und den Cy3-Fluoreszenzfarbstoff. Auch andere Kopplungsgruppen, wie SH-, Carboxy -, Aldehyd-Gruppen können eingesetzt werden.

Die Position der Kopplungsgruppe kann an einem der Enden der Oligonukleotide sein, oder auch mitten in der Sequenz liegen. Solche Oligonukleotide können von der Firma MWG-Biotech, Deutschland, synthetisiert werden.

5 Als Modifikationen können Oligonukleotide Fluoreszenzfarbstoffe oder andere Reporter-Gruppen, wie Biotin, Digoxigenin tragen. Auch mehrere Modifikationen pro ein Oligonukleotid sind möglich. Beispielsweise können FRET-Paare oder Fluoreszenzfarbstoff-Quanchermolekül-Paar in ein Oligonukleotid eingefügt werden.

10 Dieses Beispiel zeigt eine generelle Möglichkeit, an Nukleotiden weitere Modifikationen vorzunehmen. Weitere basenmodifizierte Nukleotidanaloga, wie z.B. 5-Propargylamino-dCTP, 5-Amino-Propargyl-dUTP, 7-Deaza-Aminopropargyl-dGTP und 7-Deaza-Aminopropargyl-dATP können wie oben angeführt ebenfalls modifiziert werden. Es können sowohl Ribonukleotide, 2'-Deoxyribonukleotide als auch 2',3'-Deoxyribonukleotide verwendet werden, Fig. 11 bis 14. Auch andere basenmodifizierte
15 Nukleotide können in ähnlicher Weise eingesetzt werden.

Durch Zugabe von Poly-dA oder Poly-A können mehrere dUTP-AA-SS-R-PEG-Oligo-dT31-Cy3, z.B. 10-20, zu einem Nuk-Makromolekül gekoppelt werden. Dabei entsteht ein Nuk-Makromolekül mit linear angeordneten Nuk-Linker-Komponenten (Fig. 37 C).
20 Durch Zugabe von anderen modifizierten Oligonukleotiden, die an Poly-dA oder Poly-A binden können, können auch weitere Modifikationen eingeführt werden, z.B. Fluoreszenzmarkierung.

Beispiel 40:

25 Synthese von $(\text{dATP-PA-PEG})_n\text{-PAS-(Cy3)}_m$

Die Herstellung von dATP-PA-PEG-NH₂ wurde im Beispiel 19 beschrieben.

EDA-Cy3 wurde wie folgt synthetisiert: Zu 1ml wässriger EDA-Lösung, 400 mmol/l, pH 8.5 eingestellt mit HCl, wurden 0,1 mg Cy3-NHS zugegeben. Die Reaktion wurde 30 min bei RT gerührt. Das Produkt wurde auf RP-18 getrennt (Wasser-Methanol-Gradient) und auf 0.2 ml eingengt.
30

PAS 100 kDa (35% wässrige Lösung) wurde durch mehrmaliges Einrotieren mit DMF in eine wasserfreie DMF-Lösung überführt. Anschließend wurde zu 200 µl einer 0,1 mmol/l PAS (2 mg in 200 µl) in DMF 3 mg CDI zugegeben. Reaktion erfolgte und 30
35 min bei RT. Anschließend wurden zu dieser Lösung gleichzeitig 0,2 ml 0,7 mmol/l Lösung EDA-Cy3 und 0,2 ml 0,5 mmol/l dATP-PA-PEG-NH₂ zugegeben. Die Reaktion wurde 1 Std. bei RT durchgeführt. Anschließend wurde Produkt $(\text{dATP-PA-PEG})_n\text{-PAS-}$

(Cy3)_m durch Ultrafiltration mit 100 kDa MWCO von EDA-Cy3 und dATP-PA-PEG-NH₂ getrennt.

Die durchschnittliche Zahl der Cy3-derivaten beträgt 5 pro ein PAS-Molekül, die durchschnittliche Zahl der Nuk-Einheiten (dATP) pro ein PAS-Molekül beträgt 2. Auf diese Weise wurde ein Nuk-Makromolekül synthetisiert, das mehrere Makrer-Einheiten und mehrere Nuk-Einheiten einschließt.

(dATP-PA-PEG)_n-PAS-(Cy3)_m dient als Substrat für die DNA-Polymerasen und kann in den Markierungsreaktionen eingesetzt werden.

Beispiel 41:

Nuk-Makromoleküle als Monomer-Bestandteile eines Oligonukleotides

Beispiele der enzymatischen Einbaus von Nuk-Makromolekülen in die Nukleinsäure s. Beispiel 34 und 35.

Oben wurden Kopplungen eines langen Linkers und eines Markers an Nukleotid-Monomere beschrieben, die eine reaktive Gruppe tragen. In analoger Weise kann auch ein Nukleotid-Monomer, das als Teil eines Polymeres auftritt, z.B. einer Nukleinsäurekette, und eine reaktive Gruppe trägt, ebenfalls modifiziert werden. Bevorzugt wurde bei der Modifizierung ein langer, linearer, nicht verzweigter Linker, wie PEG. Nukleotid-Monomere mit einer reaktiven Gruppe, beispielsweise einer Amino- oder Merkapto-Gruppe, können mit den Mitteln der konventionellen Oligonukleotid-Synthese in eine Nukleinsäurekette gekoppelt werden. Viele Modifikationen können bei einer Auftragssynthese, beispielsweise durch MWG-Biotech, in ein Oligonukleotid eingeführt werden.

Synthese eines modifizierten Oligonukleotids:

Ein Oligonukleotid mit 31 dT-Monomeren und einer am 5'-Ende gekoppelten Amino-Gruppe wurde von der MWG-Biotech synthetisiert (5'-Amino-dT31). An ein solches Oligonukleotid kann beispielsweise ein Fmoc-PEG-NHS Linker gekoppelt werden:

Zu 100 µl wässriger Lösung 5'-Amino-dT31, 0,5 mmol/l, pH 8,0, wurden 1mg Fmoc-PEG-NHS (Fmoc-geschützter NH₂-PEG-NHS) gegeben und bei 30°C 8 Stunden gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 11 erhöht und die Reaktionsmischung weitere 2 Stunden bei RT gerührt. Anschließend wurde das modifizierte Oligonukleotid durch Elektrophorese in einem 15% Polyacrylgel vom nicht modifizierten getrennt und isoliert. Das Produkt der Reaktion ist NH₂-PEG-dT31 wurde in 50 µl 50 mmol Hydrogencarbonat-Puffer, pH 8,0, aufgelöst (Konzentration 0,3 mmol/l). An die endständige Aminogruppe kann ein makromolekularer Marker gekoppelt werden.

Durch eine ähnliche Reaktion wie im Beispiel 40 kann ein mit einem makromolekularen Marker modifiziertes Oligonukleotid synthetisiert werden:

EDA-Cy3 wurde wie im Beispiel 40 synthetisiert. PAS 100 kDa (35% wässrige Lösung) wurde durch mehrmaliges Einrotieren mit DMF in eine wasserfreie DMF-Lösung überführt. Anschließend wurde zu 50 µl einer 0,1 mmol/l PAS in DMF 1 mg CDI (als konzentrierte Lösung in DMF) zugegeben. Reaktion erfolgte und 30 min bei RT. Anschließend wurden zu dieser Lösung gleichzeitig 50 µl 1,5 mmol/l Lösung EDA-Cy3 und 50 µl 0,3 mmol/l NH₂-PEG-dT31 zugegeben. Die Reaktion wurde 1 Std. bei RT durchgeführt. Anschließend wurde Produkt (dT31-PEG)_n-PAS-(Cy3)_m durch Ultrafiltration mit 100 kDa MWCO von EDA-Cy3 und NH₂-PEG-dT31 getrennt.

Die durchschnittliche Zahl der Cy3-derivaten beträgt 7 pro ein PAS-Molekül, die durchschnittliche Zahl der gekoppelten Oligonukleotide pro ein PAS-Molekül beträgt 1. Auf diese Weise wurde ein mit einem polymer modifiziertes Oligonukleotid synthetisiert, das ein Nuk-Makromolekül einschließt.

Beispiel 42

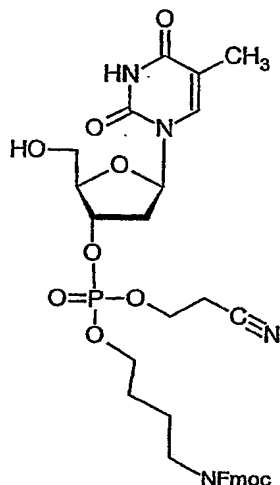
Synthese eines Nuk-Makromoleküls mit einem Linker an einer Phosphatgruppe.

Ein Linker kann auch an die Phosphatgruppen eines Nukleotids gekoppelt werden. Die Kopplung einer reaktiven Gruppe, beispielsweise einer Amino-Gruppe an die endständige Phosphatgruppe ist bereits bekannt (Jameson et al. Method in Enzymology, 1997, V 278, S. 363, A. Draganescu et al. J. Biol. Chem. 2000, V 275, 4555, Sood A. et al. J. Am. Chem. Soc. 2005, V.127, 2394). Analog zu Synthesen in anderen Beispielen kann die Linker-Komponente an das Nukleotid gekoppelt werden.

Hier wird die Synthese eines Nukleotidanalogs mit einer modifizierten 3'-Phosphatgruppe beschrieben. An eine so modifizierte Phosphatgruppe kann ein Linker gekoppelt werden.

Zunächst wird 3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(4-N-Fmoc-aminobutoxy)phosphoryl]-2'-deoxythymidin synthetisiert. Daraus erhält man anschließend durch Phosphorylierung das 5'-Triphosphat. Nach Entfernung der Fmoc-Schutzgruppe kann ein Linker an die endständige Aminofunktion gekoppelt werden.

Synthese von 3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(4-N-Fmoc-aminobutoxy)phosphoryl]-2'-deoxythymidin.



530 mg 5'-O-DMT-deoxythymidin-3'-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit und 633 mg 4-(Fmoc-amino)-1-butanol wurden bei Raumtemperatur in 8 ml wasserfreiem Acetonitril unter Schutzgas (Stickstoff) vorgelegt. Innerhalb von 5 min. wurden 4.0 ml einer 0.45M Tetrazol-Lösung in Acetonitril zugetropft. Nach 12 h wurde zur Oxidation des Phosphoramidits Cumol-Hydroperoxide (135 mg) zugegeben. Nach 30 min wurde mit 150 µl Isopropanol überschüssiges Cumol-Hydroperoxid zersetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Zur Abspaltung der DTM-Schutzgruppe wurde der Rückstand in 20 ml einer Mischung aus Essigsäure/ Wasser(8/2) gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Nach ca. 2h zeigte die Reaktionskontrolle (DC KG 60 ;Dichlormethan/Methanol = 95/5) kein Edukt mehr und es wurden 20 ml Toluol zugesetzt und das Gemisch am Rotationsverdampfer eingeeengt. Zur vollständigen Entfernung von Essigsäure und Wasser wurde noch 5 mal mit je 20 ml Toluol eingeeengt. Das erhaltene schwachrote Öl wurde durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt (2 mm PSC-Platte Merck; Dichlormethan/Methanol = 9/1).

Die Triphosphat-Synthese erfolgte nach T. Kovacs, L. Ötvös, Tetrahedron Letters, Vol 29, 4525-4588 (1988).

150 mg 3'-O-[(2-Cyanoethoxy)-(4-N-Fmoc-aminobutoxy)phosphoryl]-2'-deoxythymidin und 74 mg Protonenschwamm wurden in 0,8 ml Trimethylphosphat vorgelegt. Anschließend wurde POCl₃ zugegeben (100 mg) und 1 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 4°C abgekühlt und es wurden 2,5 ml 0,5 M Lösung

von Pyrophosphat in DMF:Tributylamin, (8:1) zugegeben. Nach 20 min wurde zur Hydrolyse 10 ml 0,2 M TEAB-Puffer, pH 8, zugesetzt.

Das Triphosphat-Nukleotid wurde mit Ethanol gefällt und auf DEAE-Cellulose und RP-18 gereinigt.

5

Für die Kopplung eines Linkers wurde anschließend die Fmoc-Schutzgruppe mit 0,1 M NaOH (30 min Raumtemperatur) entfernt.

Beispiel 43

10 Herstellung eines Nuk-Makromoleküls mit einem Linker von 4 Kettenatomen und einem wasserlöslichen linearen Polymer.

Zu 50 µl 5% PAS (100 kD) pH 6.0 wurde 5 mg EDC zugegeben und direkt danach 20 µl 100 mM AA-dUTP mM pH 8 zugegeben. Nach 30 min bei RT wurde das Produkt durch Ultrafiltration mit 50 kDa MWCO von niedrigmolekularen Substanzen getrennt.

15 Es wurden durchschnittlich ca. 4 Nukleotide pro ein Polymer-Molekül gekoppelt. Diese Nukleotide werden durch Klenow Fragment in einer Primer-abhängigen Reaktion in die Nukleinsäureketten eingebaut.

20 Der kurze Linker in diesem Beispiel kann auch als L-Kopplungseinheit des langen Linkers betrachtet werden, wobei PAS als Teil des Linkers auftritt.

Beispiel 44

Herstellung eines Nuk-Makromoleküls mit einem Linker von 25 Kettenatomen und einem wasserlöslichen linearen Polymer.

25

Zunächst wurde dCTP-PA mit Fmoc-NH-(PEG)₂-COOH modifiziert (dCTP-PA-(PEG)₂-NH₂).

Fmoc-NH-(PEG)₂-COOH wurde mit CDI aktiviert.

30 Zu den 200 µl 20 mM dCTP-PA in 100 mM Borat, pH 8.0, wurden 200 µl 40 mM aktivierten Fmoc-NH-(PEG)₂-COOH in DMF zugegeben. Nach 30 min bei RT wurde pH-Wert auf 12 mit NaOH eingestellt und das Gemisch weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach einer anschließenden Trennung mit Kieselgel und RP-18 wurde das Produkt erhalten. Ausbeute 15%.

35 Zu 50 µl 5% PAS (100 kD) pH 6.0 wurde 5 mg EDC zugegeben und direkt danach 30 µl 10 mM (dCTP-PA-(PEG)₂-NH₂) pH 7 zugegeben. Nach 30 min bei RT wurde das Produkt durch Ultrafiltration mit 50 kDa MWCO von niedrigmolekularen Substanzen getrennt.

Diese Nukleotide werden durch Klenow Fragment in einer Primer-abhängigen Reaktion in die Nukleinsäureketten eingebaut.

- 5 An das Polymer können Marker-Einheiten, beispielsweise Farbstoffe gekoppelt werden.

Beispiel 45

- 10 Herstellung eines Nuk-Makromoleküls mit einem Linker von 34 Kettenatomen und einem wasserlöslichen linearen Polymer.

Synthese von dCTP-PA-(PEG)₂-NH₂ s. Beispiel 44.

Die Aminogruppe von PEG wurde mit PDTP-NHS wie im Beispiel 1 modifiziert, so dass dCTP-PA-(PEG)₂-NH-PDTP resultierte.

15

Aminodextran 70.000 wurde durch die Reaktion mit PDTP-NHS modifiziert, wobei durchschnittlich ein Amino-Dextran-Molekül mit 1,4 PDTP-Gruppen modifiziert wurde. Durch eine anschließende Reduktion mit TCEP wurden freie SH-Gruppen erzeugt, so dass Amino-Dextran-SH resultierte. Die Reinigung erfolgte mit 10 kD WMCO.

20

Zu 200 µl 2,5% Amino-Dextran-SH (70 kD) in 50 mM Borat-Puffer, pH 9.0, wurden 10 µl 10 mM (dCTP-PA-(PEG)₂-NH-PDTP) zugegeben. Nach 120 min bei RT wurde das Produkt durch Ultrafiltration mit 10 kDa MWCO von niedrigmolekularen Substanzen getrennt. Es resultierte Aminodextran-SS-R-dCTP, wobei (R) 34 Kettenatome aufweist.

25

Diese Nukleotide werden durch Klenow Fragment in einer Primer-abhängigen Reaktion in die Nukleinsäureketten eingebaut.

- 30 An das Aminodextran können Marker-Einheiten, beispielsweise Farbstoffe gekoppelt werden.

Beispiel 46

- 35 Herstellung eines modifizierten Klenow-Fragments Exo minus der DNA-Polymerase I der E. coli (im weiteren Bezeichnet als Klenow-Fragments Exo minus).

In einer Ausführungsform der Modifikation werden zu 70 µl einer Puffer-Lösung mit Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase (750 Units-Vial von Amersham Bioscience, aufgelöst im Hersteller-Puffer: 50 mmol/l Kalium-Phosphat-Puffer, pH7, 1,0 mmol/l DTT, 50% Glycerol) 100 µl einer Puffer-Lösung (200 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 10.0, 60% Glycerin) zugegeben, der pH-Wert der Lösung mit Polymerase beträgt nun 9.0. Anschließend werden 30 µl einer 1 mol/l wässrigen Iod-Acetamid-Lösung zugegeben. Die Reaktion wird 30 min bei RT durchgeführt. Auf diese Weise erfolgt eine selektive Modifizierung der Polymerase an der SH-Gruppe des Cysteins.

In einer anderen Ausführungsform der Modifikation erfolgt zunächst eine Zugabe von 10 µl 50 mmol/l TCEP-NaOH-Lösung, pH 8, zu 70 µl einer Puffer-Lösung mit Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase (750 Units-Vial von Amersham Bioscience aufgelöst im Hersteller-Puffer, s.o.). Nach 10 min bei RT erfolgt dann die Zugabe von 100 µl einer Puffer-Lösung (200 mmol/l Tris-HCl-Puffer, pH 10.0, 60% Glycerin) zur Lösung mit Polymerase. Anschließend werden 30 µl einer 1 mol/l wässrigen Iod-Acetamid-Lösung zugegeben. Die Reaktion erfolgt 30 min bei RT. Auf diese erfolgt eine selektive Modifizierung der Polymerase an der SH-Gruppe.

Die Reinigung der modifizierten Polymerase kann beispielsweise über Ultrafiltration oder über Ionenaustauscher oder Dialyse erfolgen.

Die Aufbewahrung der modifizierten Polymerase erfolgt beispielsweise in einem glycerinhaltigen Puffer. Als Puffer eignen sich beispielsweise Tris-HCl, Borat, Phosphat-Puffer. Der pH-Wert dieser Puffer liegt beispielsweise zwischen 5 und 10. Die Konzentration des Glycerins kann beispielsweise zwischen 10 und 70% liegen.

Auch andere Reagenzien, wie beispielsweise PEG oder Salze wie NaCl, NH₄Cl können zur Polymerase-Lösung zugegeben werden. Vorzugsweise wird kein Reduzierungsmittel, wie beispielsweise DTT, zur Lösung mit Polymerase zugegeben.

In einer Ausführungsform enthält der Aufbewahrungspuffer zusätzlich ein Reagenz, das mit SH-Gruppen selektiv reagieren kann, beispielsweise IodAcetamid in Konzentration zwischen 1 mmol/l und 500 mmol/l.

Eine auf diese Weise modifizierte Polymerase kann anstelle von Klenow-Fragment Exo-minus der DNA-Polymerase in Reaktionen mit Nuk-Makromolekülen eingesetzt werden.

Makromolekulare Nukleotidverbindungen und Methoden zu deren Anwendung

Patentansprüche:

1. Makromolekulare Verbindungen mit der Struktur:

(Nuk-Linker)_n-Marker

wobei:

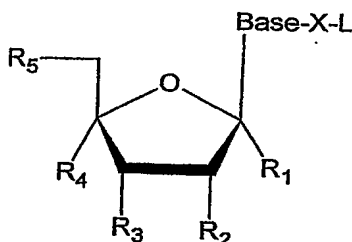
Nuk - ein Nukleotid oder ein Nukleosid ist

Linker - eine Linker-Komponente, die Nuk-Komponente und die makromolekulare Marker-Komponente verbindet

Marker - eine makromolekulare Marker-Komponente ist

n - eine Zahl von 1 bis 1000 ist

2. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren Modifikationen, wobei X die Kopplungsstelle des Linkers an der Base ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L).

R₁ - ist H

R₂ - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH₂, SH oder geschützte OH-Gruppe

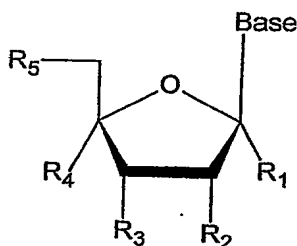
R₃ - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, PO₃, SH, N₃, NH₂, O-CH₃, O-CH₂-O-CH₃, O-CH₂-CH=CH₂, O-R₃₋₁, P(O)_m-R₃₋₁ (m ist gleich 1 oder 2), NH-R₃₋₁, S-R₃₋₁, Si-R₃₋₁ wobei R₃₋₁ eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist.

R₄ - ist H oder OH

R_5 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Tetraphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

5

3. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

10

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

R_1 - ist H

15

R_2 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Halogen, NH_2 , SH oder geschützte OH-Gruppe

20

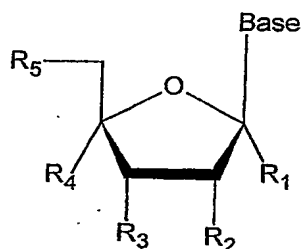
R_3 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R_{3-2} -L, $P(O)_m$ - R_{3-2} -L, wobei m 1 oder 2 ist, NH - R_{3-2} -L, S - R_{3-2} -L, Si - R_{3-2} -L oder, wobei R_{3-2} die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L) ist.

R_4 - ist H oder OH

25

R_5 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe OH, oder eine geschützte OH-Gruppe, oder eine Monophosphat-Gruppe, oder eine Diphosphat-Gruppe, oder eine Triphosphat-Gruppe, oder eine Tetraphosphat-Gruppe, oder eine Alpha-Thiotriphosphat-Gruppe ist.

4. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1, wobei die Nuk-Komponente folgende Strukturen einschließt:



Wobei:

Base - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe von Adenin, oder 7-Deazaadenin, oder Guanin, oder 7-Deazaguanin, oder Thymin, oder Cytosin, oder Uracil, oder deren zu enzymatischen Reaktionen fähigen Modifikationen

R_1 - ist H

R_2 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, NH_2 , SH oder geschützte OH-Gruppe

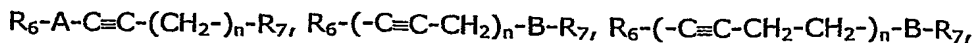
R_3 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe H, OH, Hal, PO_3 , SH, NH_2 , O- R_{3-1} , $\text{P}(\text{O})_m$ - R_{3-1} (m ist gleich 1 oder 2), $\text{NH}-R_{3-1}$, $\text{S}-R_{3-1}$, $\text{Si}-R_{3-1}$ wobei R_{3-1} eine chemisch, photochemisch oder enzymatisch spaltbare Gruppe ist.

R_4 - ist H oder OH

R_5 - ist unabhängig gewählt aus der Gruppe O- R_{5-1} -L, oder $\text{P}(\text{O})_3$ - R_{5-1} -L (modifizierte Monophosphat-Gruppe), oder $\text{P}(\text{O})_3$ - $\text{P}(\text{O})_3$ - R_{5-1} -L (modifizierte Diphosphat-Gruppe) oder $\text{P}(\text{O})_3$ - $\text{P}(\text{O})_3$ - $\text{P}(\text{O})_3$ - R_{5-1} -L (modifizierte Triphosphat-Gruppe), wobei R_{5-1} die Kopplungsstelle des Linkers an das Nukleotid ist und L - die Kopplungseinheit des Linkers (L) ist.

5. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 4, wobei die Kopplungseinheit des Linkers (L) folgende strukturelle Elemente einschließt:

R_6 -NH- R_7 , R_6 -O- R_7 , R_6 -S- R_7 , R_6 -SS- R_7 , R_6 -CO-NH- R_7 , R_6 -NH-CO- R_7 , R_6 -CO-O- R_7 , R_6 -O-CO- R_7 , R_6 -CO-S- R_7 , R_6 -S-CO- R_7 , R_6 - $\text{P}(\text{O})_2$ - R_7 , R_6 -Si- R_7 , R_6 -(CH_2) $_n$ - R_7 , R_6 -(CH_2) $_n$ - R_7 , R_6 -A-(CH_2) $_n$ - R_7 , R_6 -(CH_2) $_n$ -B- R_7 , R_6 -(CH=CH-) $_n$ - R_7 , R_6 -(A-CH=CH-) $_n$ - R_7 , R_6 -(CH=CH-B-) $_n$ - R_7 , R_6 -A-CH=CH-(CH_2) $_n$ - R_7 , R_6 -(-CH=CH- CH_2) $_n$ -B- R_7 , R_6 -(C≡C-) $_n$ - R_7 , R_6 -(A-C≡C-) $_n$ - R_7 , R_6 -(C≡C-B-) $_n$ - R_7 ,



wobei R_6 - die Nuk-Komponente ist, R_7 - der Linkerrest ist und A und B folgende strukturelle Elemente einschließen: -NH-, -O-, -S-, -SS-, -CO-NH-, -NH-CO-, -CO-O-, -O-CO-, -CO-S-, -S-CO-, -P(O)₂-, -Si-, -(CH₂)_n-, eine photolabile Gruppe, wobei n - gleich 1 bis 5 ist

6. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 5, wobei die Linker-Komponente ein wasserlösliches Polymer einschließt.

7. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 6, wobei die Linker-Komponente wasserlösliche Polymere unabhängig ausgewählt aus folgender Gruppe einschließt:

Polyethylen-glycol (PEG), Polysaccharide, Dextran, Polyamide, Polypeptide, Polyphosphate, Polyacetate, Poly(alkyleneglycole), Kopolymere aus Ethylenglycol und Propylenglycol, Poly(olefinische Alkohole), Poly(Vinylpyrrolidone), Poly(Hydroxyalkylmethacrylamide), Poly(Hydroxyalkylmethacrylate), Poly(α-Hydroxy-Säuren), Poly-Acrylsäure, Poly-Acrylamid, Poly(Vinylalkohol).

8. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 7, wobei ein Linker-Komponente eine durchschnittliche Länge zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 10000, 10000 und 50000, 50000 bis 100000, 100000 bis 500000 Atome (Kettenatome) hat.

9. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 8, wobei eine Marker-Komponente eine signalgebende, signalvermittelnde, katalytische oder affine Funktion hat

10. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente aus einer strukturellen Marker-Einheit besteht

11. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, wobei eine Marker-Komponente mehrere strukturelle Marker-Einheiten einschließt

12. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden strukturellen Elemente einschließt:

Biotin, Hapten; radioaktives Isotop, seltene Erdenatom, Farbstoff, Fluoreszenzfarbstoff.

13. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 10 oder 11, wobei eine strukturelle Marker-Einheit unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt:

Nanokristalle oder deren Modifikationen, Proteine oder deren Modifikationen, Nukleinsäureketten oder deren Modifikationen, Teilchen oder deren Modifikationen.

14. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eines der folgenden Proteine einschließt:

Enzyme oder deren Konjugate oder Modifikationen,
Antikörper oder deren Konjugate oder Modifikationen,
Streptavidin oder seine Konjugate oder Modifikationen,
Avidin oder seine Konjugate oder Modifikationen

15. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 13, wobei eine strukturelle Marker-Einheit eine der folgenden Arten Nukleinsäureketten einschließt: DNA, RNA, PNA, wobei die Länge von Nukleinsäureketten zwischen 10 und 10.000 Nukleotide liegt

16. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 11 bis 15, wobei die Marker-Einheiten durch eine oder mehrere Kern-komponenten untereinander zu einer Marker-Komponente verbunden sind.

17. Makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 16, wobei eine Kern-komponente unabhängig eines der folgenden Elemente einschließt: wasserlöslichen Polymer aus der Gruppe von: Polyamide (z.B. Polypeptide), Polysaccharide, Dextran, Poly-Acrylsäure und deren Derivate, Poly-Acrylamide und deren Derivate, Poly-Vinylalkohole und deren Derivate, Nukleinsäuren und deren Derivate, Streptavidin oder Avidin und deren Derivate, Dendrimere, wobei diese Elemente linear oder verzweigt oder unter einander vernetzt sein können

18. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 10, wobei die Verbindung zwischen einer strukturellen Marker-Einheit und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

5 19. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 9, 11 bis 17, wobei die Verbindung zwischen der Kern-Komponente und dem Linker kovalent oder affine erfolgt

10 20. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Kettenatome beträgt.

15 21. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 20, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Kettenatome beträgt
20 und die Linker-Komponente eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

25 22. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 21, wobei nur eine Nuk-Komponente mit einer gekoppelten Linker-Komponente an die Marker-Komponente gebunden ist, wobei die Linkerlänge zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Kettenatome beträgt
30 und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in einen wachsenden Strang eingebaut werden kann.

35 23. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19 wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt sind, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Kettenatome beträgt.

24. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, 23, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Kettenatome beträgt und der jeweilige Linker eine oder mehrere unter milden Bedingungen spaltbare Verbindungen beinhaltet.

25. Makromolekulare Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 19, 23, 24, wobei mehrere Nuk-Komponenten jeweils über einen Linker an einer Marker-Komponenten gekoppelt, wobei die Länge der jeweiligen Linker-Komponente zwischen 2 bis 5, 5 bis 10, 10 bis 20, 20 bis 50, 50 bis 100, 100 bis 200, 200 bis 500, 500 bis 1000, 1000 bis 2000, 2000 bis 5000, 5000 bis 20000, 20000 bis 100000 Kettenatome beträgt und ein oder mehrere Teile des Nuk-Makromoleküls dermaßen modifiziert sind, dass nur eine Nuk-Komponente in eine wachsende Nukleinsäurekette eingebaut werden kann.

26. Oligonucleotide oder Polynucleotide die mindestens ein Nuk-Makromolekül nach Ansprüchen 1 bis 25 pro eine Nukleinsäurekette einschließen.

27. Oligonucleotide oder Polynucleotide nach Anspruch 26, wobei Oligo- oder Polynucleotide RNA, DNA oder PNA sind, deren Länge zwischen 5 und 50.000 Nukleotide beträgt.

28. Verfahren zur Modifizierung von Nukleinsäureketten, wobei für die Kopplung Nuk-Makromoleküle nach Ansprüchen 1 bis 25 verwendet werden

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Ansprüchen 1 bis 25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten,

30. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine enzymatische Kopplung erfolgt und das Reaktionsgemisch folgende Komponenten einschließt:

- mindestens eine Art der Nuk-Makromoleküle oder deren Zwischenstufen nach Ansprüchen 1-25, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt
- mindestens eine Population der Nukleinsäureketten,
- mindestens eine Enzymart zur Kopplung von Nuk-Makromoleküle an die Nukleinsäureketten
- mindestens eine weitere Art von Nukleosidtriphosphaten

31. Verfahren nach Ansprüchen 29, 30, wobei die Enzymart unabhängig eine der folgenden Gruppen einschließt: DNA-Polymerase, RNA-Polymerase, Terminale Transferase,

32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: Ribonukleosidtriphosphaten (ATP, GTP, UTP, CTP), von 2'-Deoxyribonukleosidtriphosphaten (dATP, dUTP, dTTP, dCTP, dGTP), von 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddATP, ddGTP, ddUTP, ddCTP, ddTTP).

33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die "weitere Art" der Nukleosidtriphosphaten konventionell modifizierte Nukleotide mit einer Markierung sind, wobei diese Markierung unabhängig ausgewählt ist aus der Gruppe von: ein Fluoreszenzfarbstoff, ein Biotin, ein Hapten, ein radioaktives Element.

34. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 33, wobei mindestens zwei unterschiedliche Populationen an Nukleinsäureketten präsent sind

35. Verfahren nach Anspruch 34, wobei mindestens eine der Populationen der Nukleinsäureketten eine Primer-Funktion hat und mindestens eine Population der Nukleinsäureketten eine Matrizen-Funktion.

36. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Modifizierung durch eine chemische Kopplung erfolgt, wobei die Kopplung der Nuk-Makromoleküle an Nukleinsäureketten durch Phosphoramidit-Kopplung erfolgt.

5 37. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die die Kopplung nur einer einzigen Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäure-Strang zulassen und der mehrfache Einbau durch Modifikationen an der Nuk-Komponente, und/oder der Linker-Komponente und/oder der Marker-Komponente verhindert wird.

38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die weitere Kopplung reversibel verhindert wird.

10 39. Verfahren nach Anspruch 37, wobei die weitere Kopplung irreversibel verhindert wird.

15 40. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 36, wobei im Markierungsverfahren Nuk-Makromoleküle eingesetzt werden, die eine Kopplung mehrerer Nuk-Komponente in den wachsenden Nukleinsäurestrang zulassen

20 41. Verfahren nach Ansprüchen 28-40, wobei die an der Reaktion teilnehmenden Nukleinsäureketten an eine feste Phase gekoppelt sind und adressierbare Positionen haben.

42. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Nukleinsäureketten eine einheitliche Population darstellen

25 43. Verfahren nach Anspruch 41, wobei die Nukleinsäureketten zwei oder mehrere unterschiedliche Populationen darstellen und jede der Populationen eine adressierbare Position auf der festen Phase hat

30 44. Verfahren nach Ansprüchen 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

45. Verfahren nach Ansprüchen 41,42, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen an einer Population einheitlicher, an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der in den wachsenden Nukleinsäurestrang eingebauten Nuk-Komponente abgetrennt wird.

46. Verfahren nach Ansprüchen 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen jeweils unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente des Nuk-Makromoleküls nach der Kopplung am verlängerten Nukleinsäurestrang verbleibt und nicht abgetrennt wird.

47. Verfahren nach Ansprüchen 41,43, wobei die Kopplung von Nuk-Makromolekülen in einem Reaktionsansatz parallel an zwei oder mehreren unterschiedlichen Populationen an der festen Phase fixierter Nukleinsäuremoleküle erfolgt, wobei diese Populationen unterschiedliche adressierbare Positionen an der festen Phase haben und die Marker-Komponente oder ihre einzelnen Komponenten mit oder ohne Linker-Komponente des Nuk-Makromoleküls während der Kopplung oder nach der Kopplung von der Nuk-Komponente abgetrennt wird.

48. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen auf der festen Phase als Spots auf einer planen Oberfläche verteilt sind, wobei pro ein Spot Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

49. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen an den Kügelchen bzw. Partikel befestigt sind, wobei pro ein Kügelchen Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

50. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 47, wobei die adressierbaren Positionen mit Nukleinsäuremolekülen in einem Multigefäßsystem, wie Mikrotiterplatte oder Nanotiterplatte oder Pikotiterplatte, verteilt sind, wobei in einem Gefäß des Multigefäßsystems die Nukleinsäuremoleküle einheitlich sind.

51. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 35 und 37 bis 50, das folgende Schritte einschließt:

- 5 a) Bereitstellung mindestens einer Population an einzelsträngigen Nukleinsäureketten (NSK)
 - b) Hybridisierung von Primern an diese Nukleinsäureketten, wobei extensionsfähige NSK-Primer-Komplexe entstehen
 - 10 c) Inkubation von mindestens einer Art der Nuk-Makromoleküle nach Ansprüchen 1 bis 25 zusammen mit einer Art der Polymerase nach Anspruch 31 mit den in Schritten a und b bereitgestellten NSK-Primer-Komplexen unter Bedingungen, die den Einbau von komplementären Nuk-Makromolekülen zulassen, wobei jede Art der Nuk-Makromoleküle eine für sie charakteristische Markierung besitzt.
 - 15 d) Entfernung der nicht eingebauten Nuk-Makromoleküle von den NSK-Primer-Komplexen
 - e) Detektion der Signale von in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
 - f) Entfernung der Linker-Komponente und der Marker-Komponente von den
 - 20 in die NSK-Primer-Komplexe eingebauten Nuk-Makromolekülen
 - g) Waschen der NSK-Primer-Komplexe
- gegebenenfalls Wiederholung der Schritte (c) bis (g).

25 52. Verfahren nach Ansprüchen 28-40, wobei die Nukleinsäureketten an eine feste Phase in zufälliger Anordnung gekoppelt sind.

53. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 41, 52 zur parallelen Sequenzanalyse von Nukleinsäuresequenzen (Nukleinsäureketten, NSKs), bei dem man

30 Fragmente (NSKFs) einzelsträngiger NSKs mit einer Länge von etwa 50 bis 1000 Nukleotiden erzeugt, die überlappende Teilsequenzen einer Gesamtsequenz darstellen können, man

35 die NSKFs unter Verwendung eines einheitlichen oder mehrerer unterschiedlichen Primer in Form von NSKF-Primer-Komplexen auf einer Reaktionsoberfläche in einer zufälligen Anordnung bindet, man

eine zyklische Aufbaureaktion des komplementären Stranges der NSKFs unter Verwendung einer oder mehrerer Polymerasen durchführt, indem man

5 a) zu den auf der Oberfläche gebundenen NSF-Primer-Komplexen eine Lösung zugibt, die eine oder mehrere Polymerasen und ein bis vier Nuk-Makromoleküle enthält, die eine mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Marker-Komponente haben, wobei die bei gleichzeitiger Verwendung von mindestens
10 zwei Nuk-Makromoleküle jeweils an die Marker-Komponente befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe so gewählt sind, dass sich die verwendeten Nuk-Makromoleküle durch Messung unterschiedlicher Fluoreszenzsignale voneinander unterscheiden lassen, wobei die Nuk-Makromoleküle strukturell so modifiziert sind, dass die Polymerase nach Einbau eines solchen Nuk-Makromoleküls in einen wachsenden komplementären Strang nicht in der
15 Lage ist, ein weiteres Nuk-Makromolekül in denselben Strang einzubauen, wobei die Linker-Komponente mit der Marker-Komponente abspaltbar sind, man

20 b) die in Stufe a) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen inkubiert, die zur Verlängerung der komplementären Stränge geeignet sind, wobei die komplementären Stränge jeweils um ein Nuk-Makromolekül verlängert werden, man

25 c) die in Stufe b) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung nicht in einen komplementären Strang eingebauter Nuk-Makromoleküle geeignet sind, man

30 d) die einzelnen, in komplementäre Stränge eingebauten Nuk-Makromoleküle durch Messen des für den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Signals detektiert, wobei man gleichzeitig die relative Position der einzelnen Fluoreszenzsignale auf der Reaktionsoberfläche bestimmt, man

35 e) zur Erzeugung unmarkierter (NTs oder) NSKFs die Linker-Komponente und die Marker-Komponente von den am komplementären Strang angefügten Nuk-Komponenten abspaltet, man

f) die in Stufe e) erhaltene stationäre Phase unter Bedingungen wäscht, die zur Entfernung der Marker-Komponente geeignet sind, man

die Stufen a) bis f) gegebenenfalls mehrfach wiederholt,

5

wobei man die relative Position einzelner NSKF-Primer-Komplexe auf der Reaktionsoberfläche und die Sequenz dieser NSKFs durch spezifische Zuordnung der in Stufe d) in aufeinanderfolgenden Zyklen an den jeweiligen Positionen detektierten Fluoreszenzsignale zu den Nuk-Makromolekülen bestimmt.

10

54. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus nur jeweils eine Art der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

15

55. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

20

56. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in jedem Zyklus jeweils vier unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle einsetzt.

25

57. Verfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass die NSKs Varianten einer bekannten Referenzsequenz sind und man die Stufen a) bis f) der zyklischen Aufbaureaktion mehrfach wiederholt, wobei man in den Zyklen abwechselnd jeweils zwei unterschiedlich markierte Arten der Nuk-Makromoleküle und zwei unmarkierte NTs einsetzt und man die Gesamtsequenzen durch Vergleich mit der Referenzsequenz ermittelt.

30

58. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man in die NSKFs jeweils eine Primerbindungsstelle (PBS) einführt, wobei man bei doppelsträngigen NSKs an beiden komplementären Einzelsträngen jeweils eine PBS einführt und wobei die Primerbindungsstellen für alle NSKFs jeweils gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

35

59. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs mit Primern in einer Lösung unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen, und man die gebildeten NSKF-Primer-Komplexe anschließend auf der Reaktionsoberfläche bindet.

60. Verfahren nach den Ansprüchen 53 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass man die NSKFs zunächst auf der Reaktionsoberfläche immobilisiert und erst anschließend mit Primern unter Bedingungen in Kontakt bringt, die zur Hybridisierung der Primer an die Primerbindungsstellen (PBSs) der NSKFs geeignet sind, wobei NSKF-Primer-Komplexe gebildet werden, wobei die Primer untereinander gleiche oder verschiedene Sequenzen aufweisen.

61. Verfahren nach Ansprüchen 53 bis 60, bei dem an 10 bis 100.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt

62. Verfahren nach Ansprüchen 53 bis 60, bei dem an 100.000 bis 100.000.000 unterschiedlichen Sequenzpopulationen die Einbaureaktion parallel durchgeführt.

63. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 62, wobei die Sequenzen der Nukleinsäureketten ermittelt werden

64. Verfahren nach Ansprüchen 28 bis 63, wobei die Marker-Komponente fluoreszent markiert ist

65. Verfahren nach Ansprüchen 41 bis 64, wobei die feste Phase unabhängig aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Silicon, Glas, Keramik, Kunststoffe, Gele oder deren Modifikationen

66. Ein Kit, das die makromolekularen Verbindungen nach Ansprüchen 1 bis 25 einschließt.

67. Verfahren, bei denen makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 1 bis 25 in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden, wobei Enzyme folgende Gruppen einschließen: Polymerasen, Ligasen, Nukleasen (Endo oder Exonukleasen).

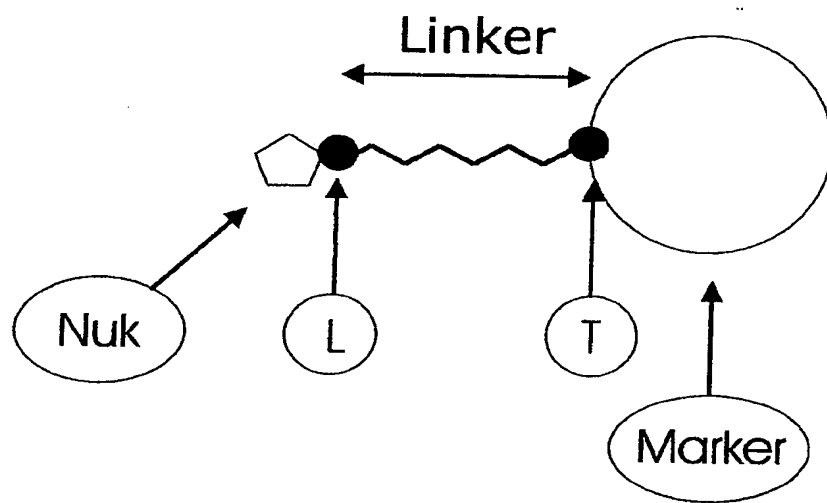
5

68. Verfahren, bei denen makromolekulare Verbindungen nach Anspruch 26 und 27 in enzymatischen Reaktionen eingesetzt werden, wobei Enzyme folgende Gruppen einschließen: Polymerasen, Ligasen, Nukleasen (Endo oder Exonukleasen).

10

1/51

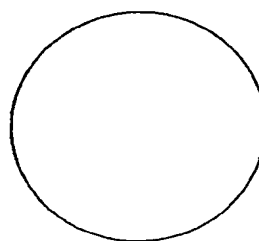
Fig. 1



Nuk-Komponente



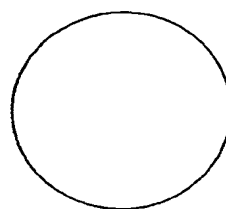
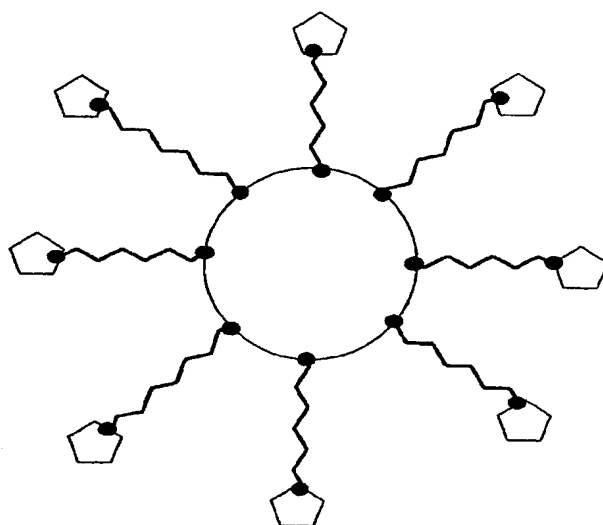
Linker-Komponente



Marker-Komponente

2/51

Fig. 2



Nuk-Komponente

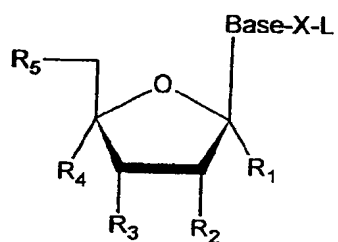
Linker-Komponente

Marker-Komponente

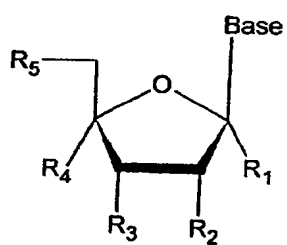
3/51

Fig. 3

A)

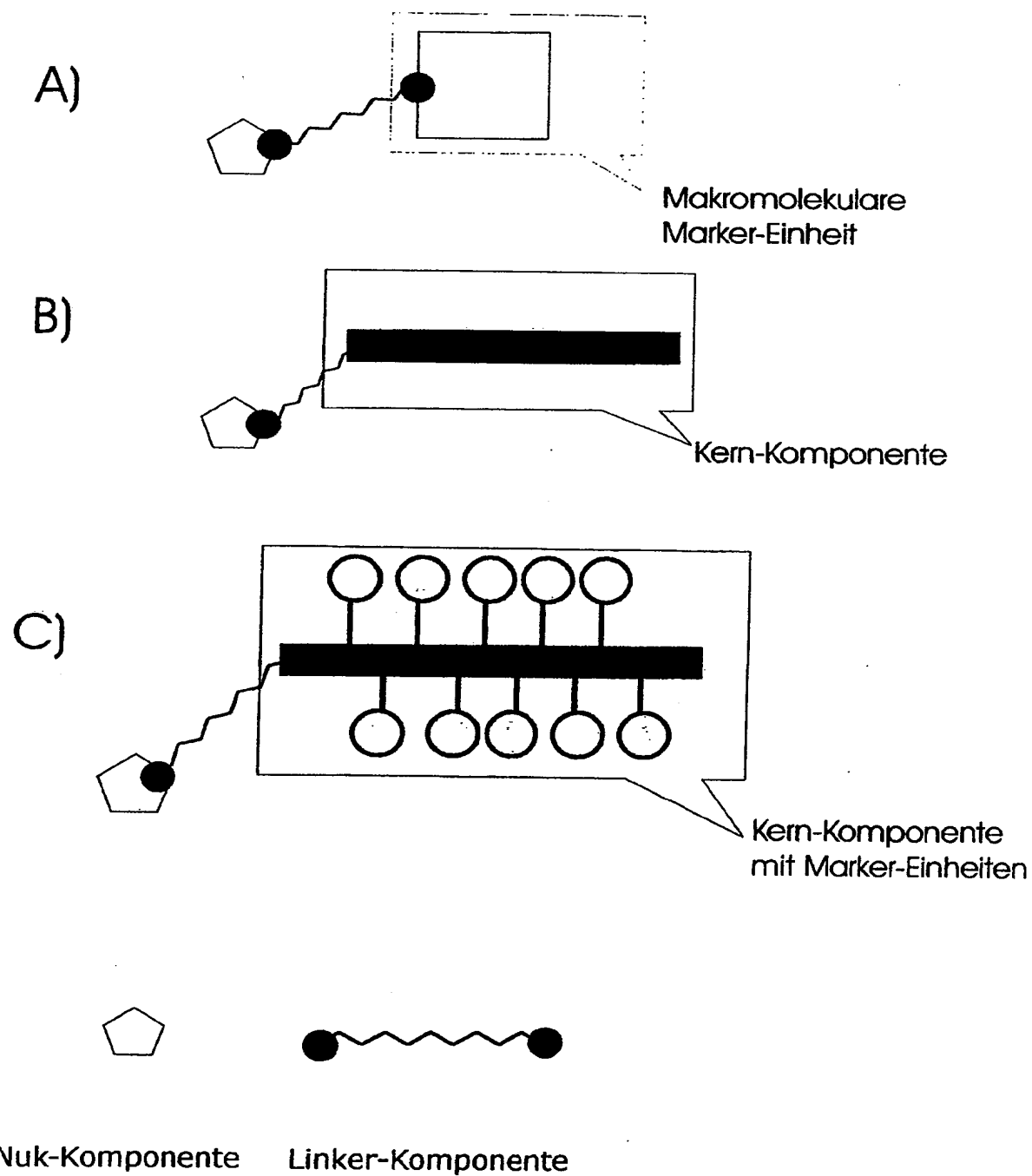


B)



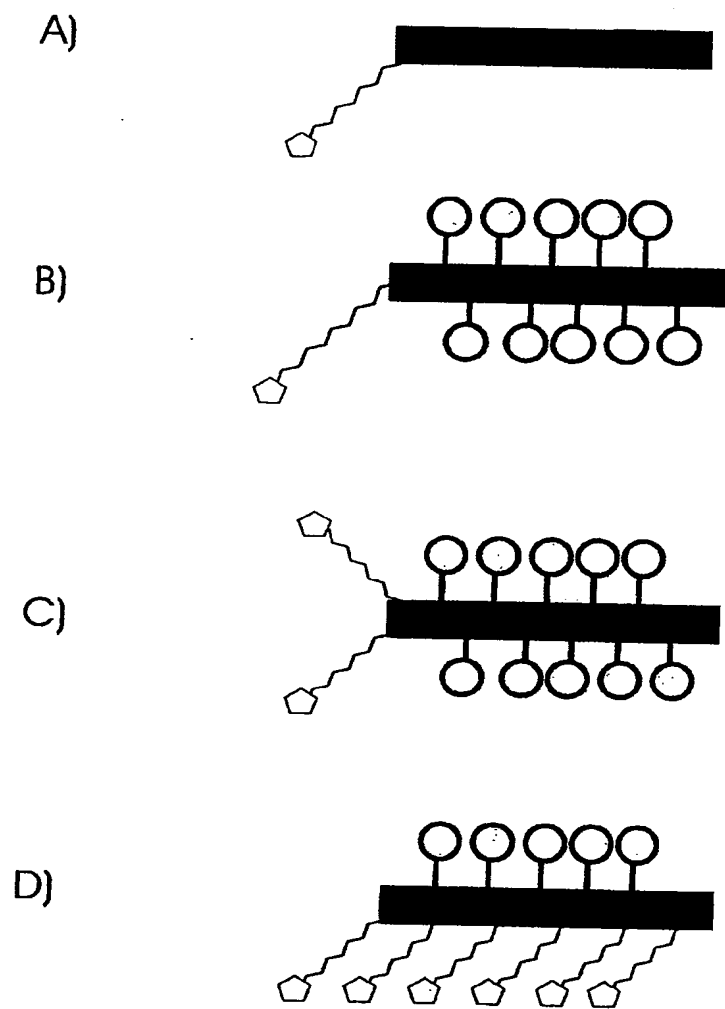
4/51

Fig. 4



5/51

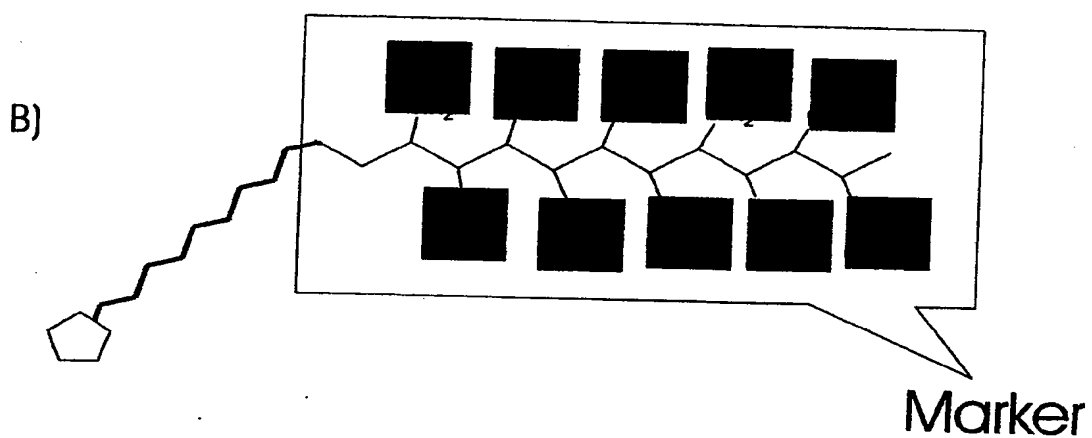
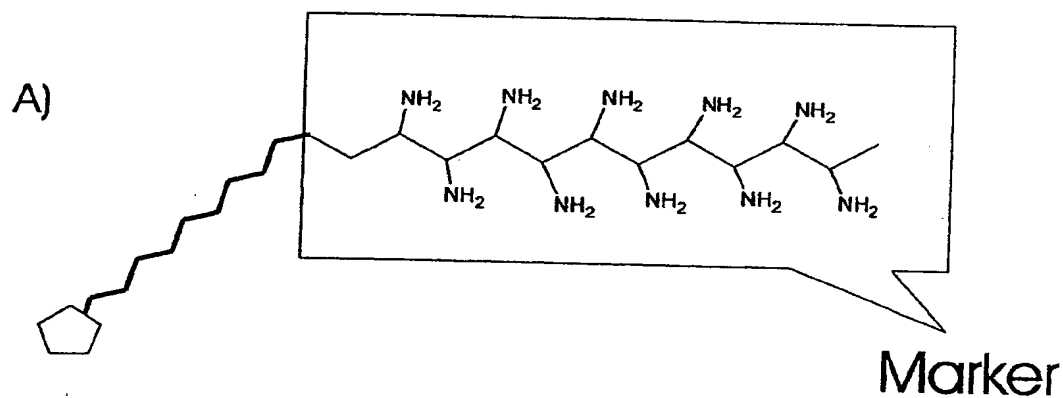
Fig. 5



Vuk-Komponente Linker-Komponente Kern-Komponente Marker-Einheit an einem Linker

6/51

Fig. 6



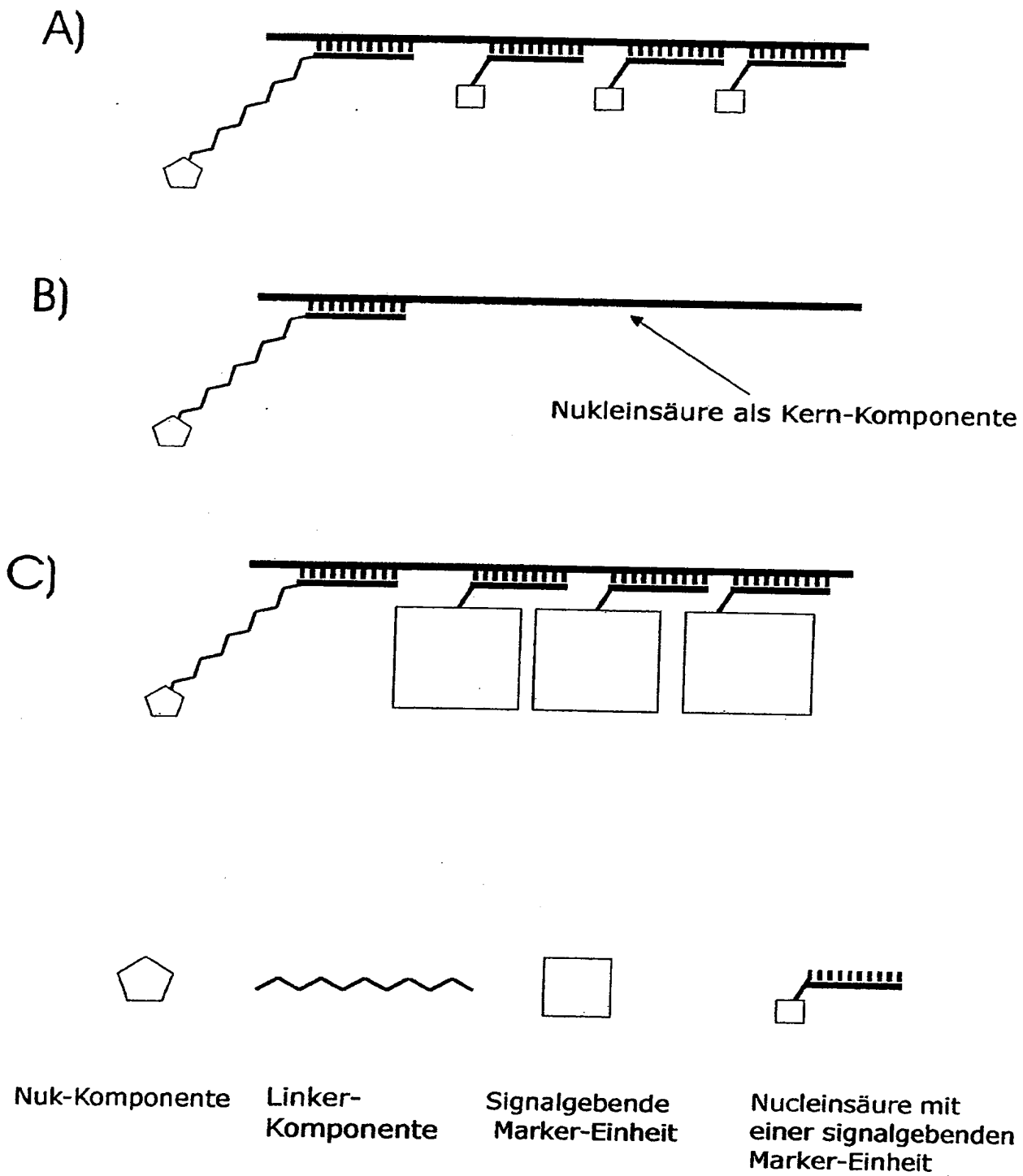
Nuk-Komponente

Linker-Komponente

Signalgebende
Marker-Einheit

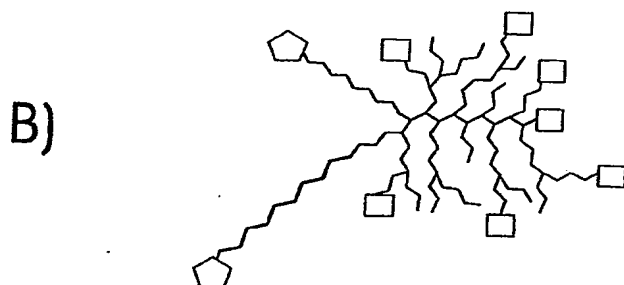
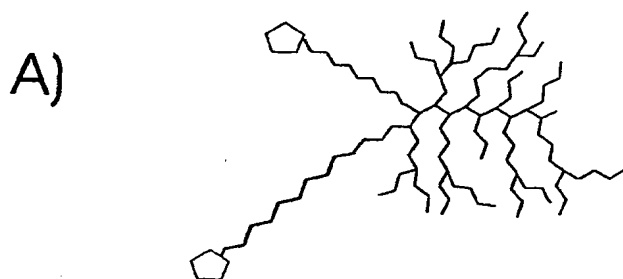
7/51

Fig. 7



8/51

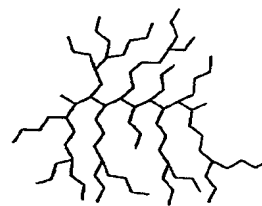
Fig. 8



Nuk-Komponente

Linker-Komponente

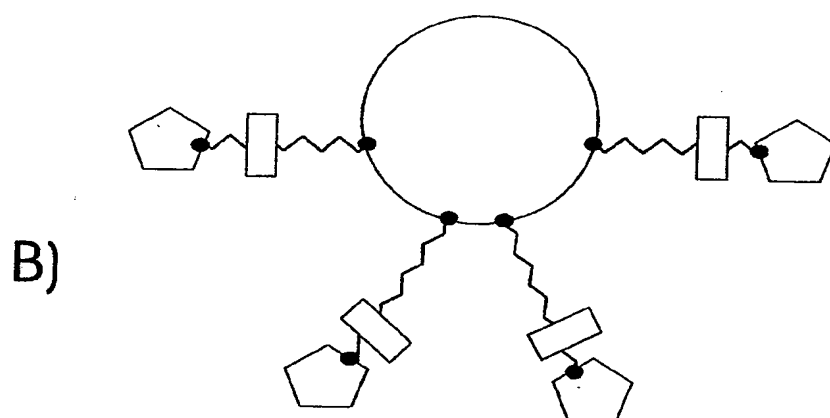
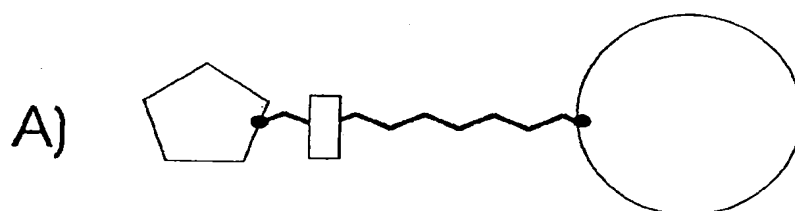
Signalgebende
Marker-Einheit



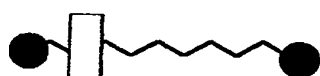
Verzweigtes Polymer
als Kern-Komponente,
z.B. Dendrimer

9/51

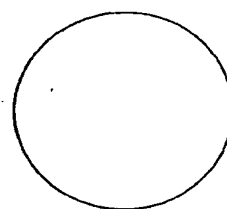
Fig. 9



Nuk-Komponente



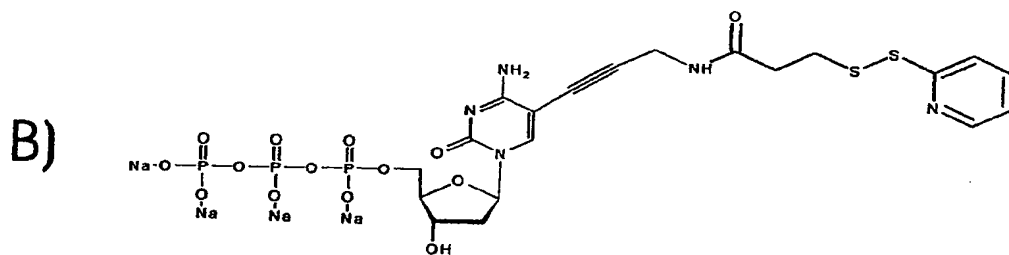
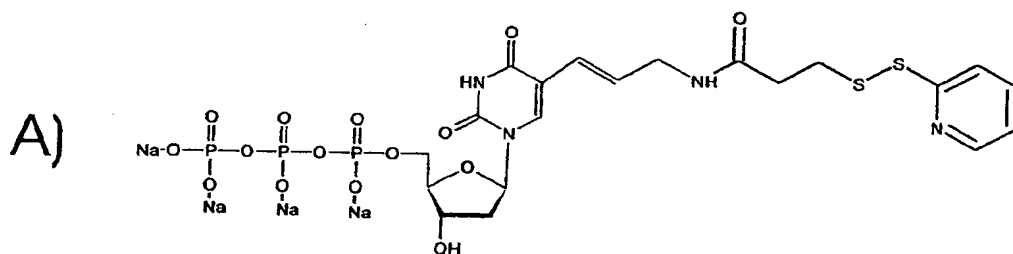
Linker-Komponente
mit einer
spaltbaren Verbindung



Marker-Komponente

10/51

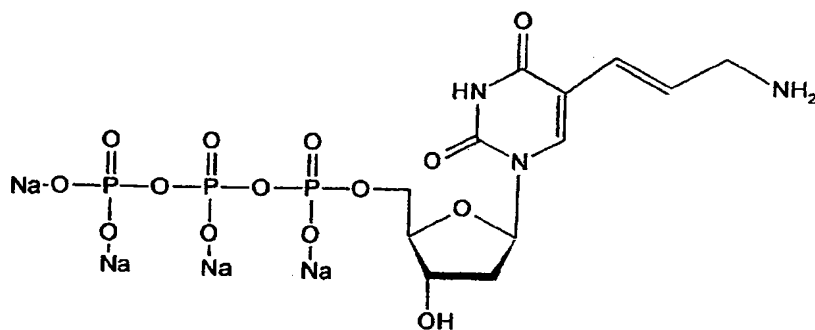
Fig. 10



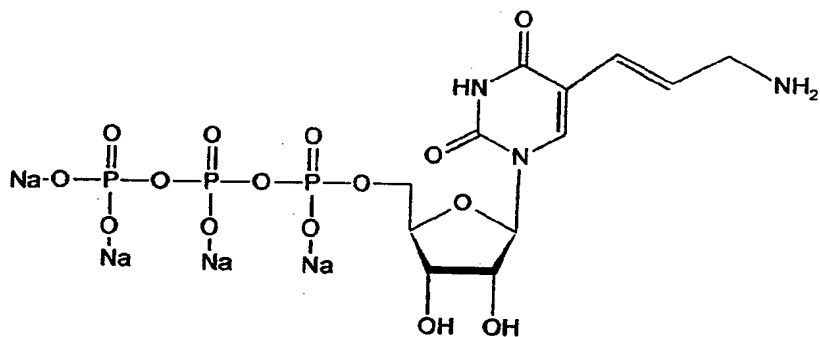
11/51

Fig. 11

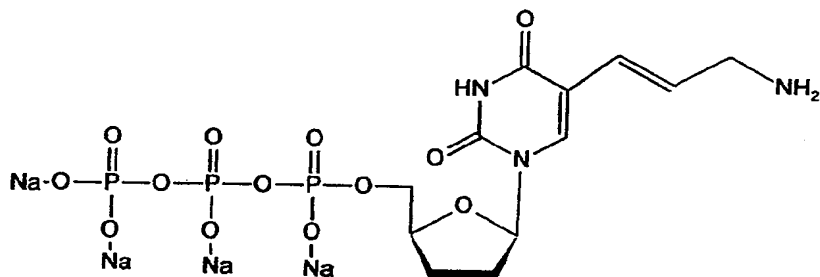
A)



B)

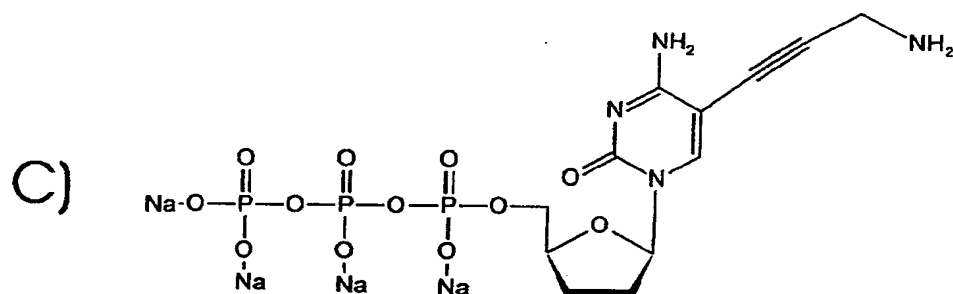
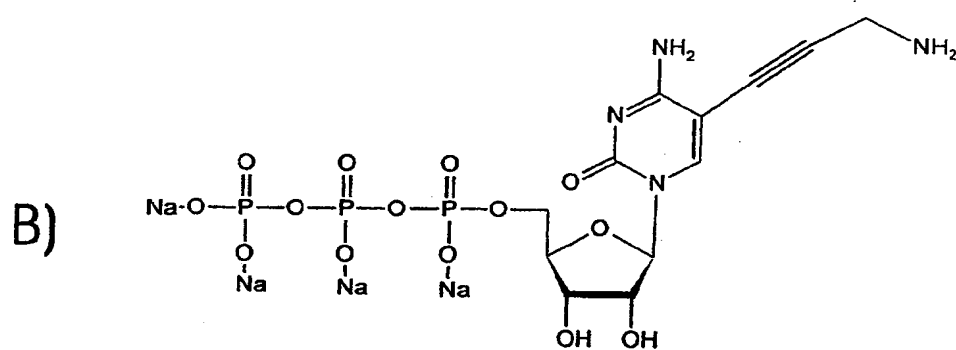
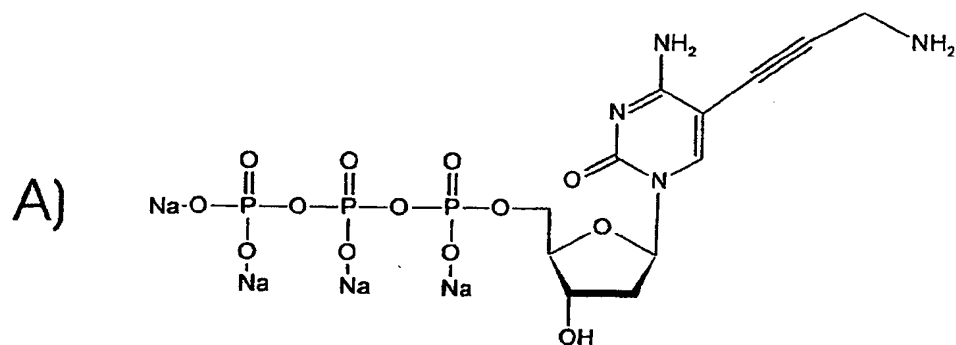


C)



12/51

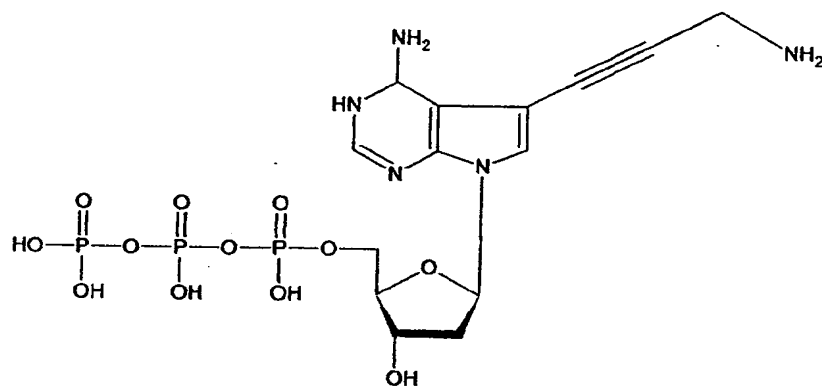
Fig. 12



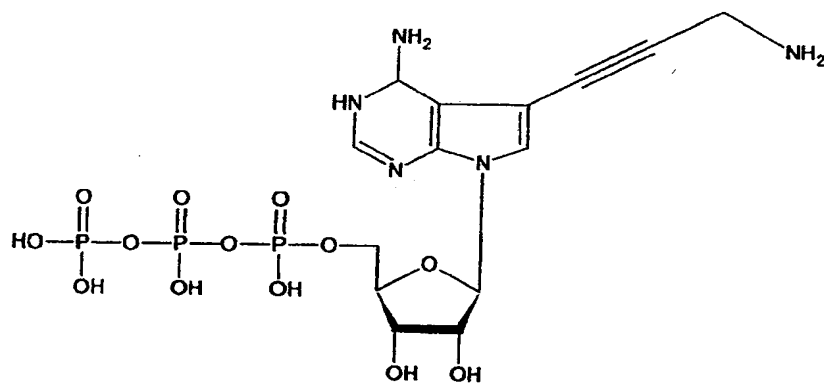
13/51

Fig. 13

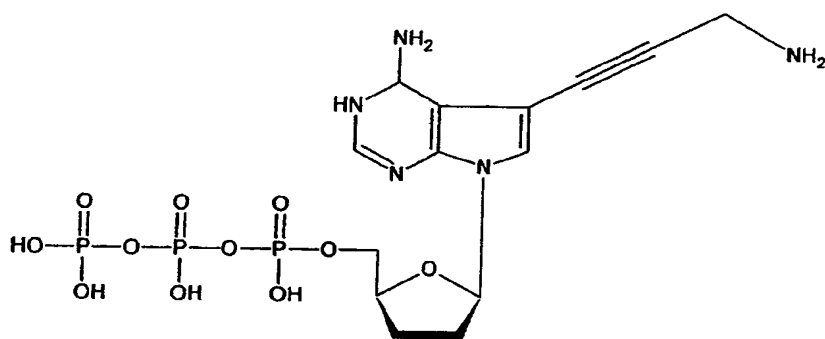
A)



B)



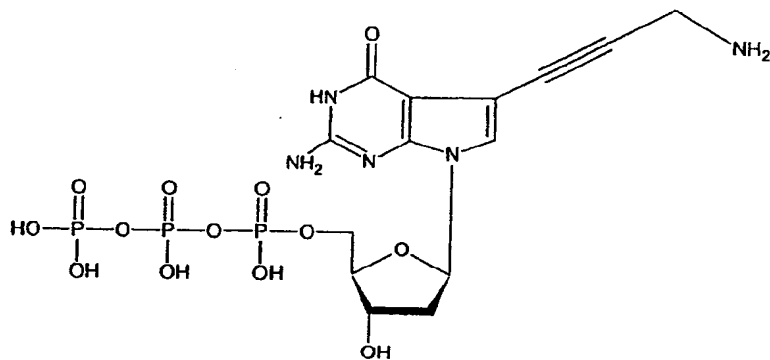
C)



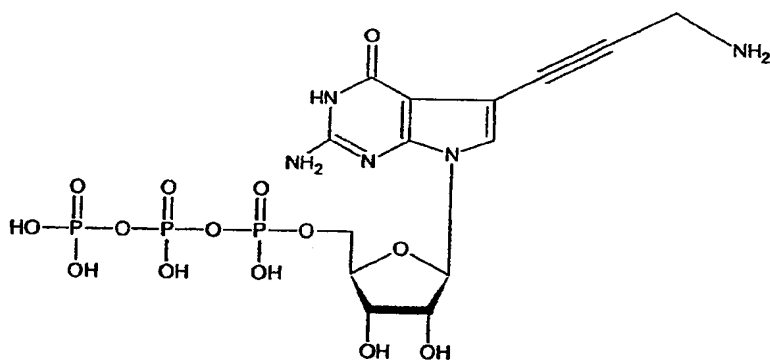
14/51

Fig. 14

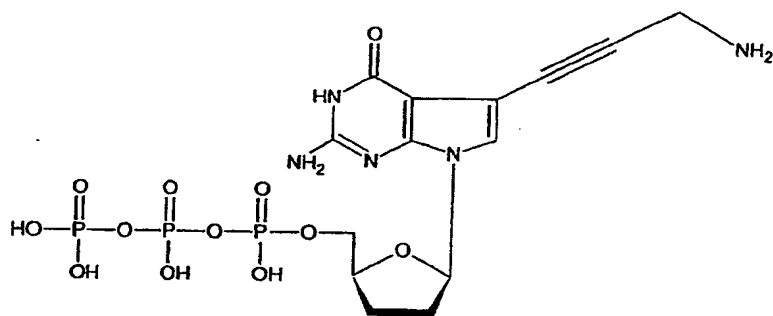
A)



B)

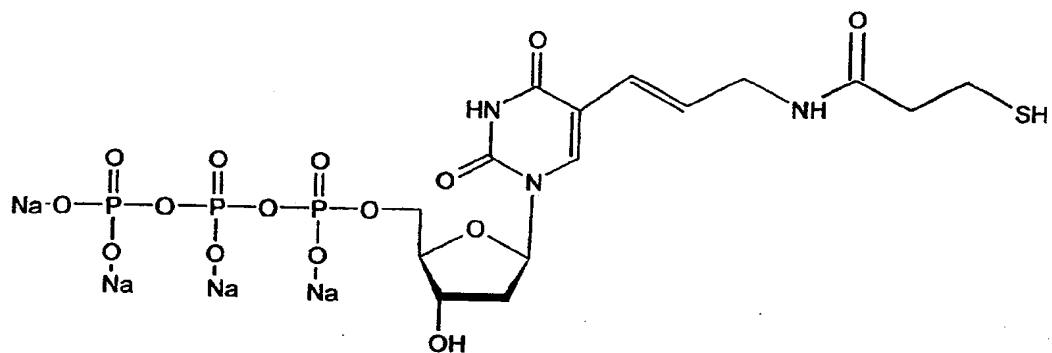


C)



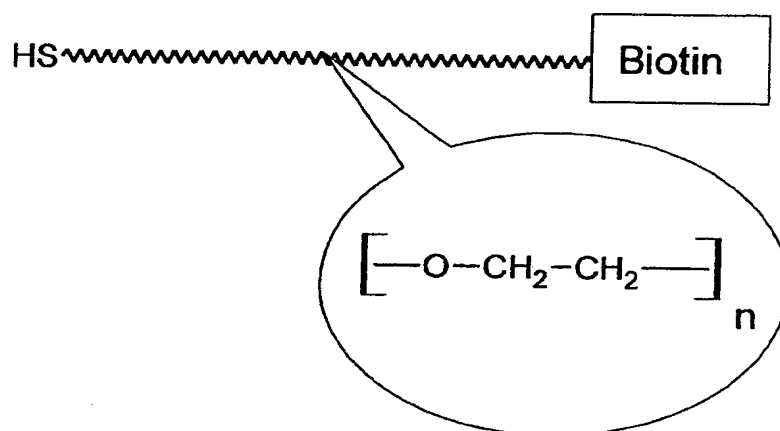
15/51

Fig. 15



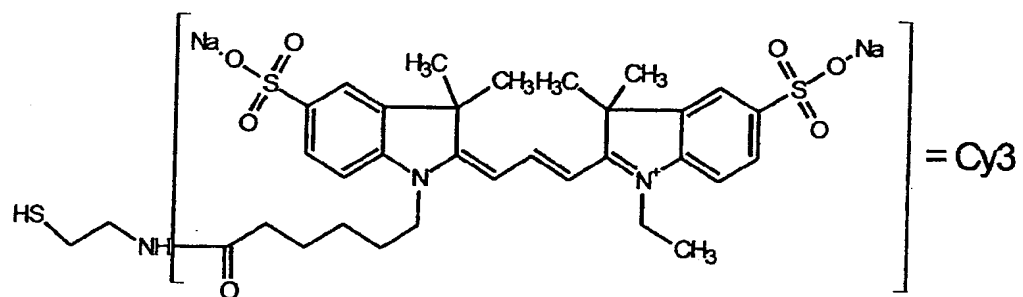
16/51

Fig. 16



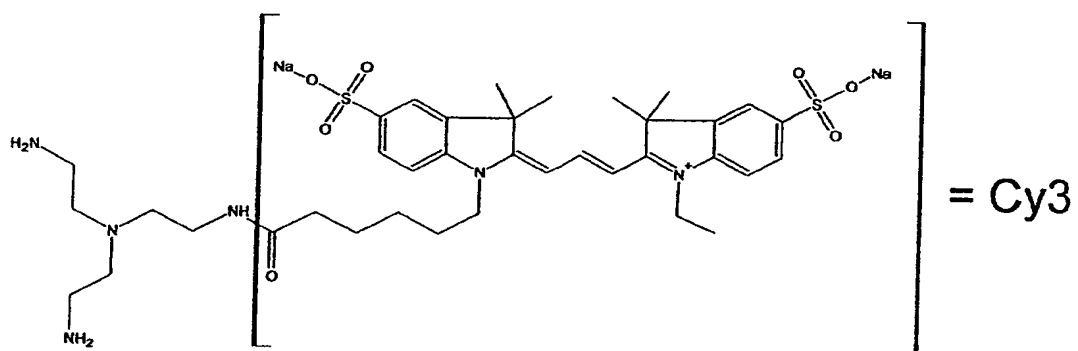
17/51

Fig. 17



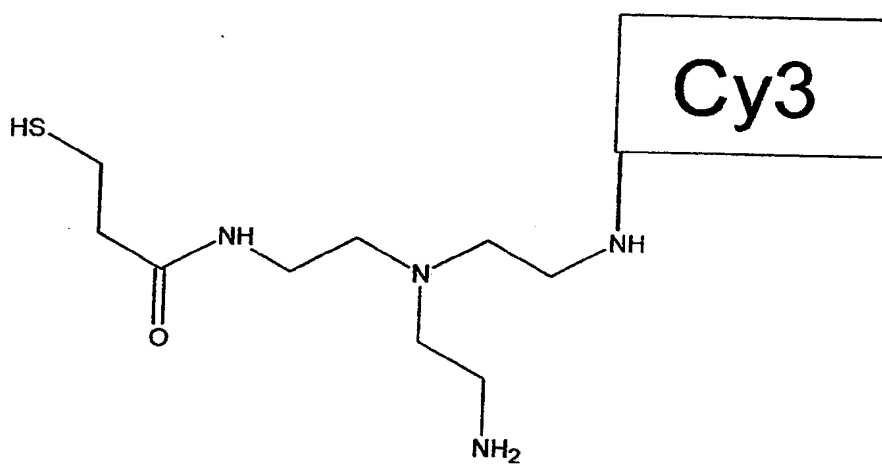
18/51

Fig. 18



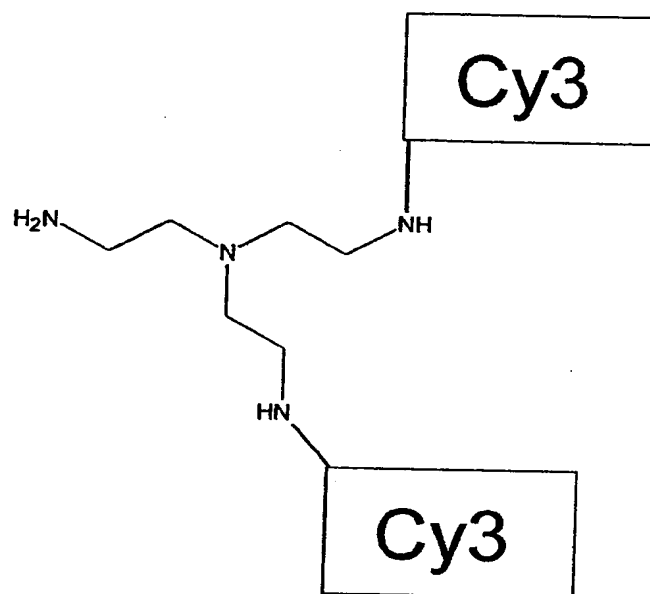
19/51

Fig. 19



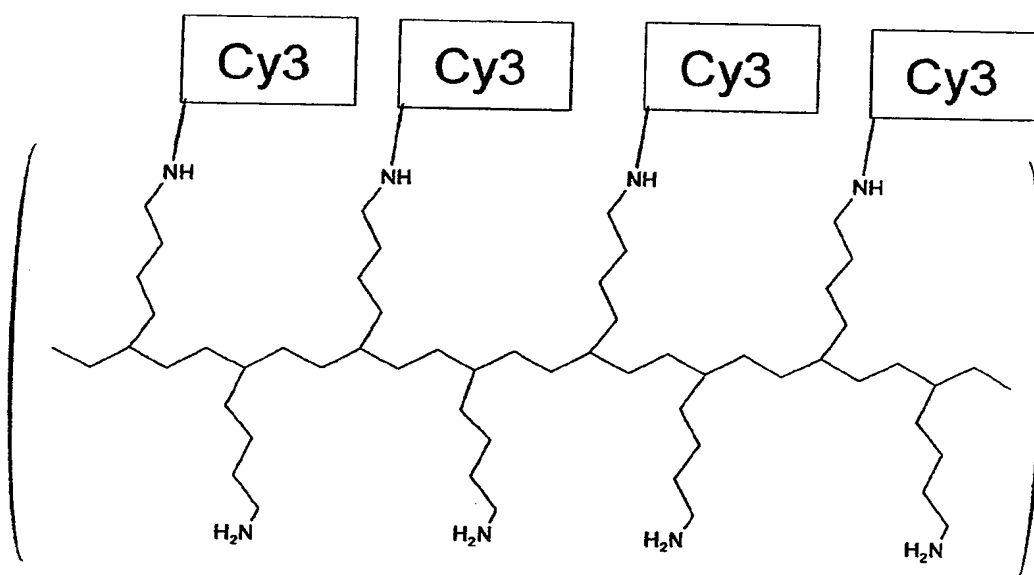
20/51

Fig. 20



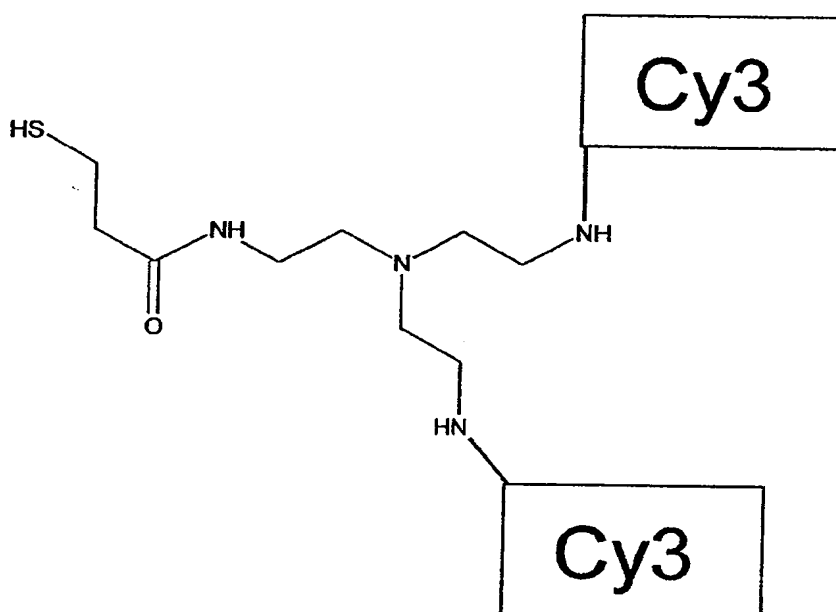
21/51

Fig. 21



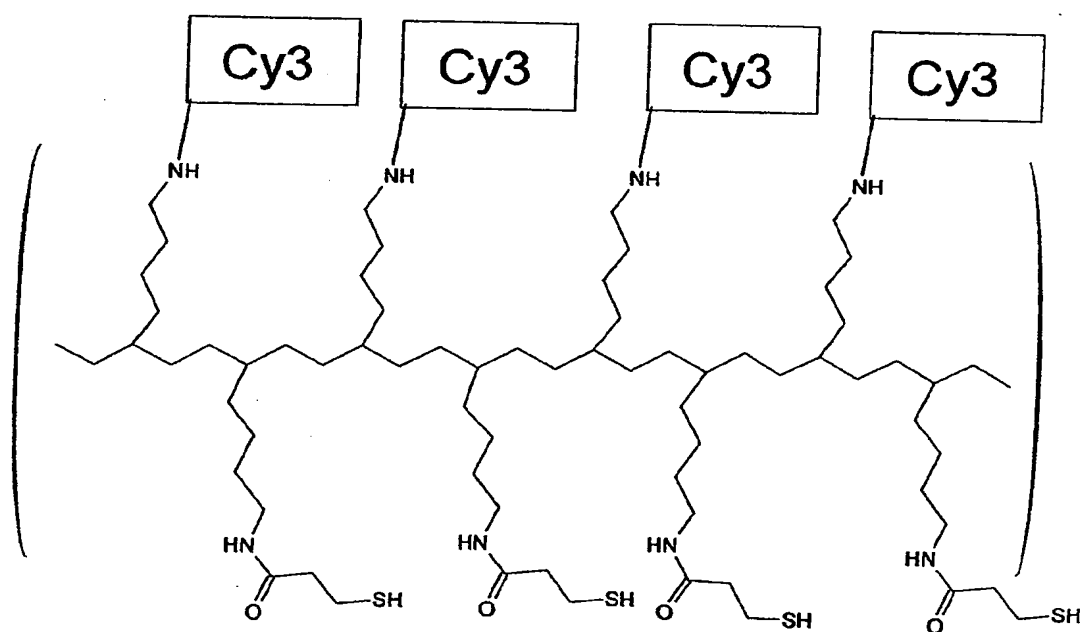
22/51

Fig. 22



23/51

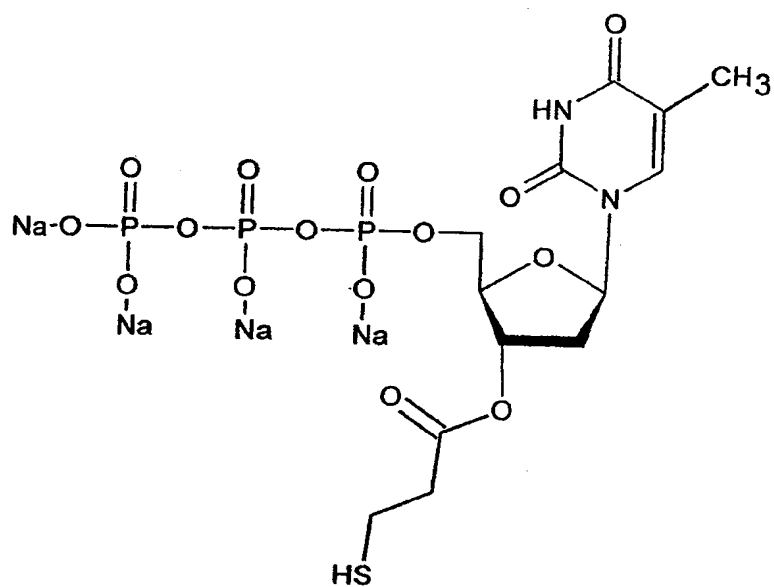
Fig. 23



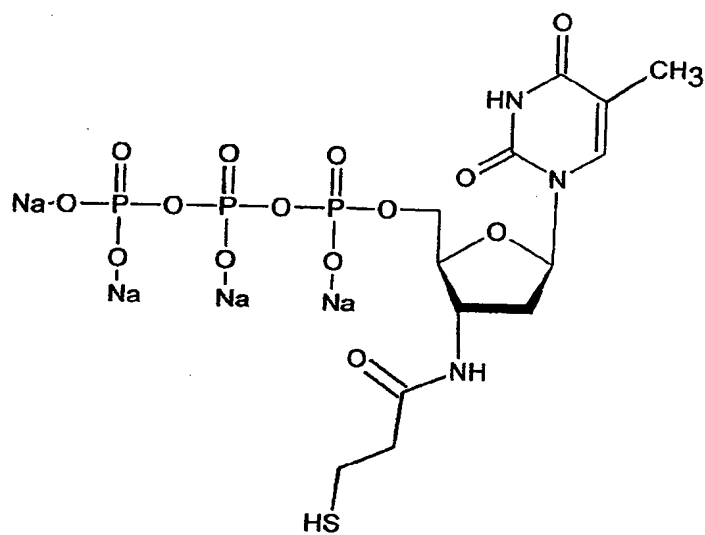
24/51

Fig. 24

A)

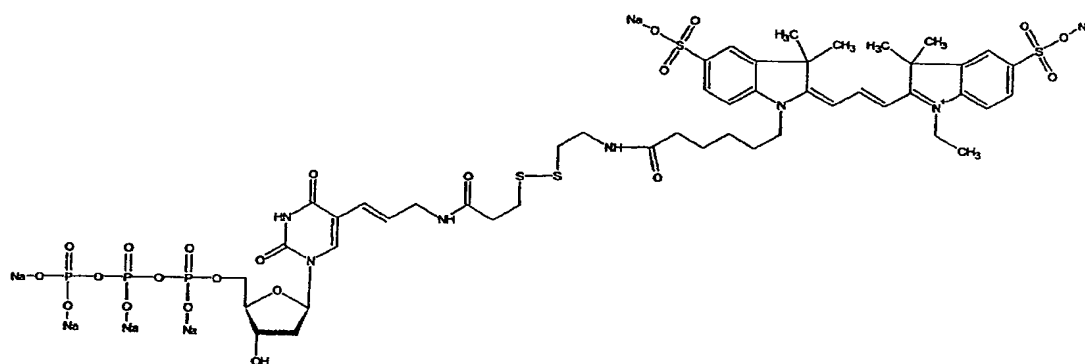


B)



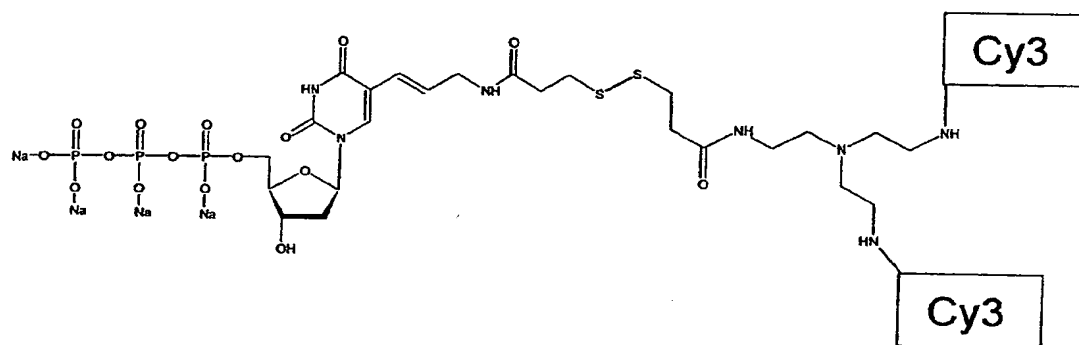
25/51

Fig. 25



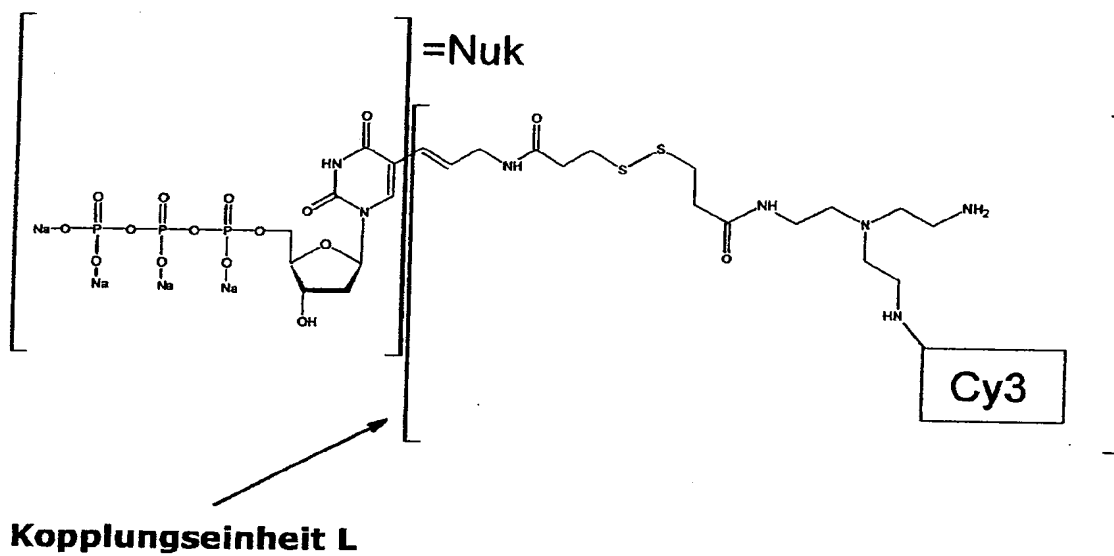
26/51

Fig. 26



27/51

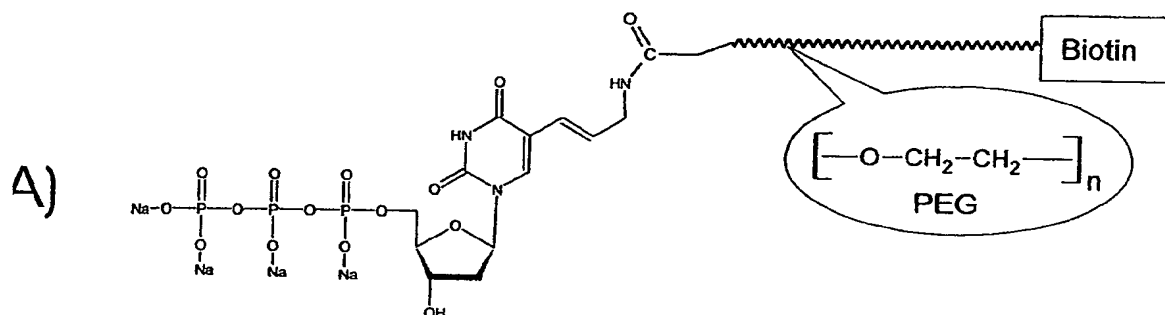
Fig. 27



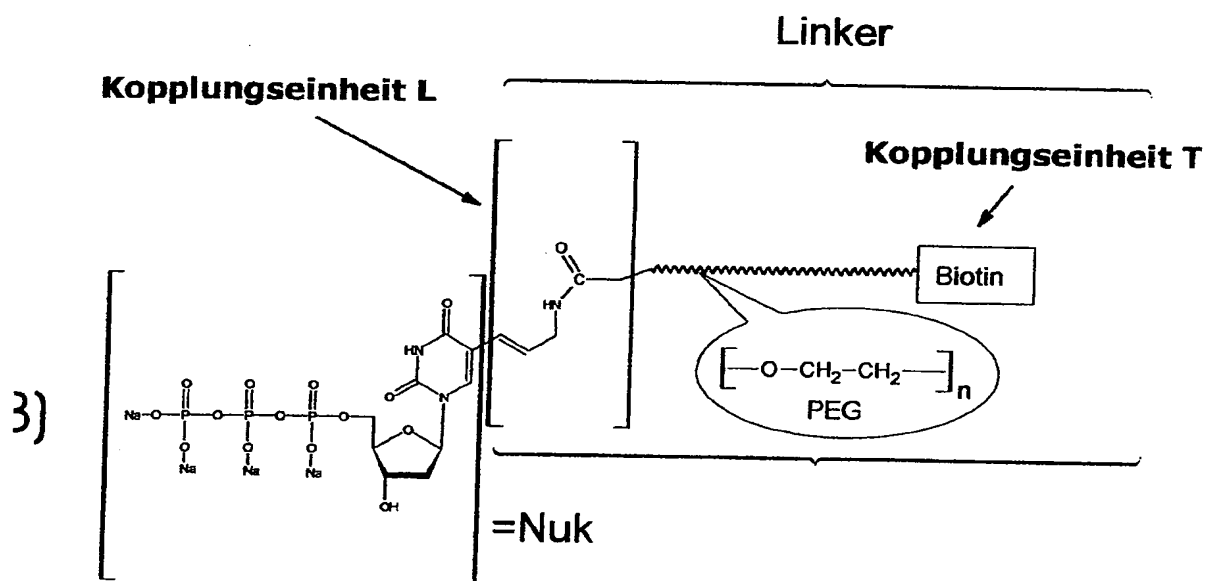
28/51

Fig. 28

Chemische Struktur der Nuk-Linker-Komponente

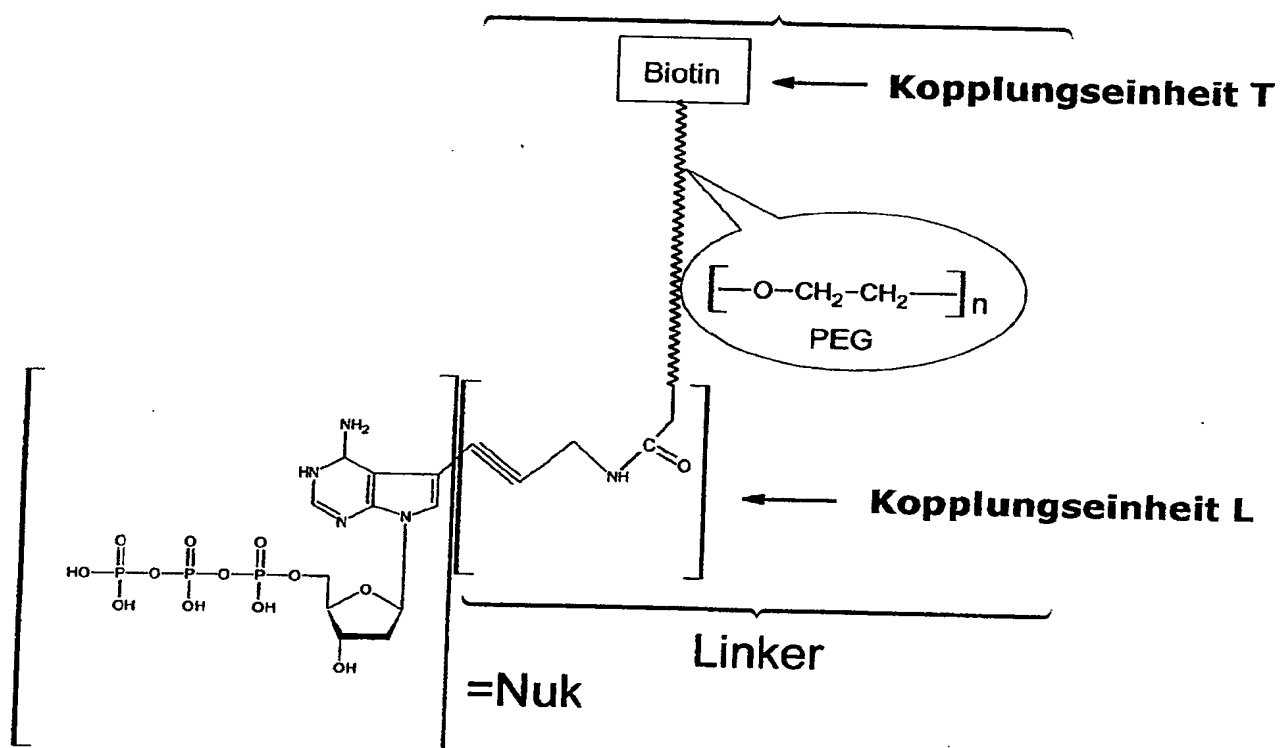


Schematische Aufteilung in einzelne Komponenten



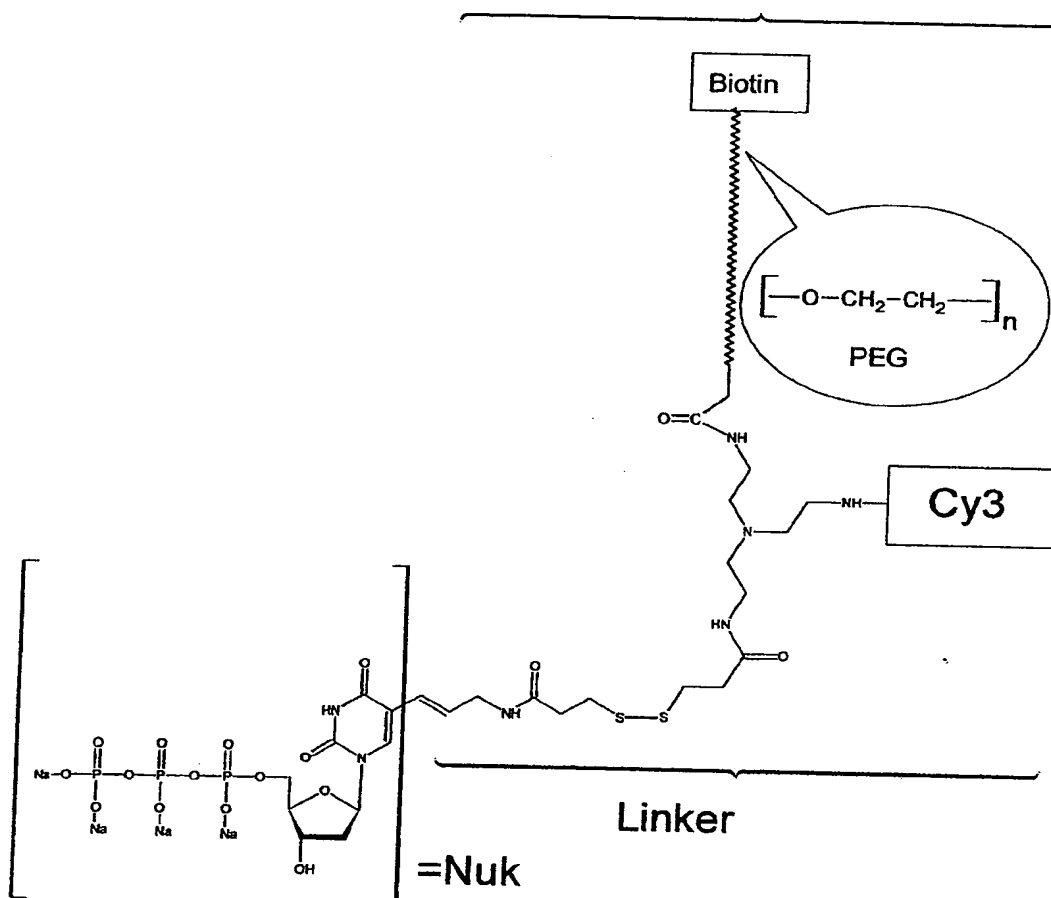
29/51

Fig. 29



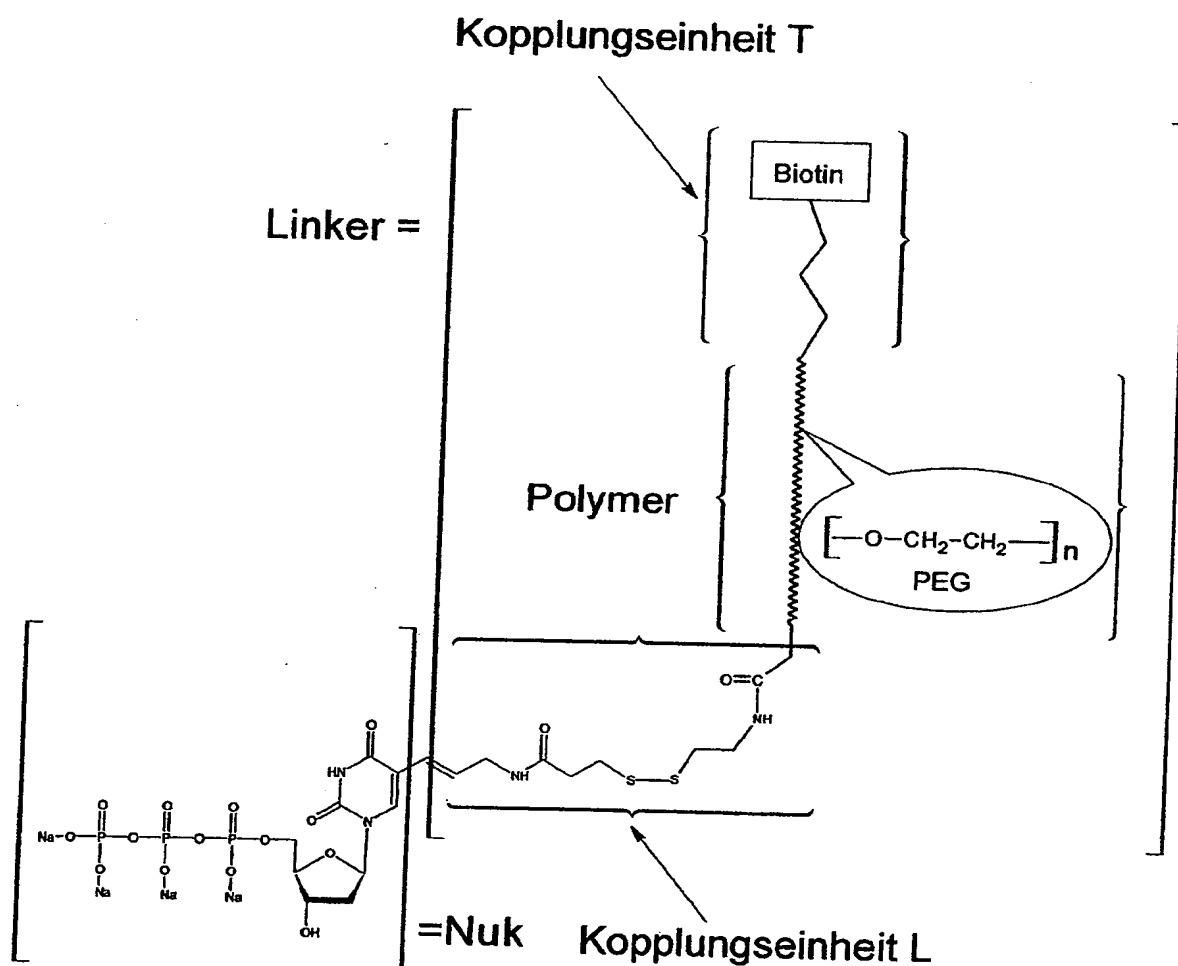
30/51

Fig. 30



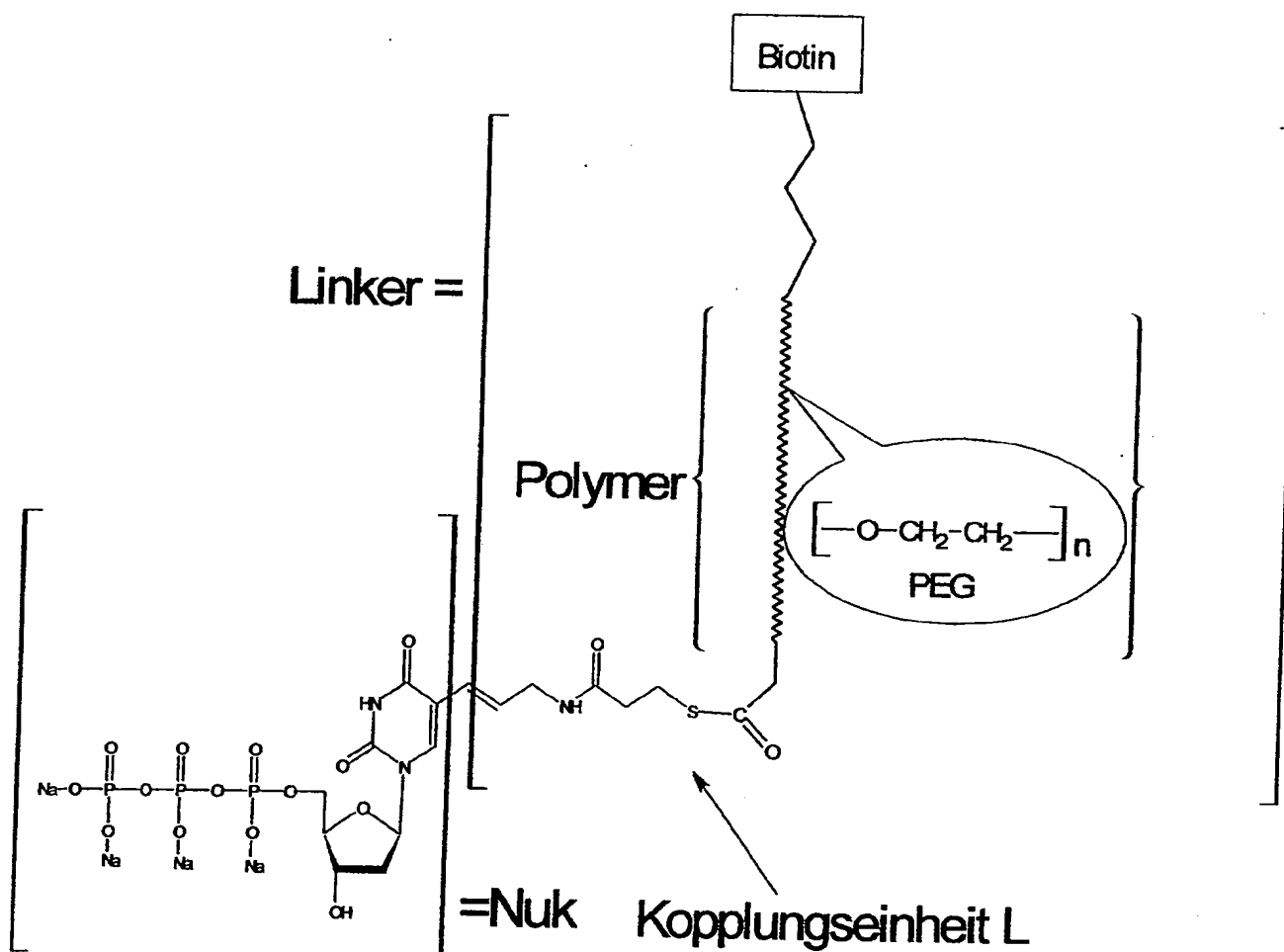
31/51

Fig. 31 A



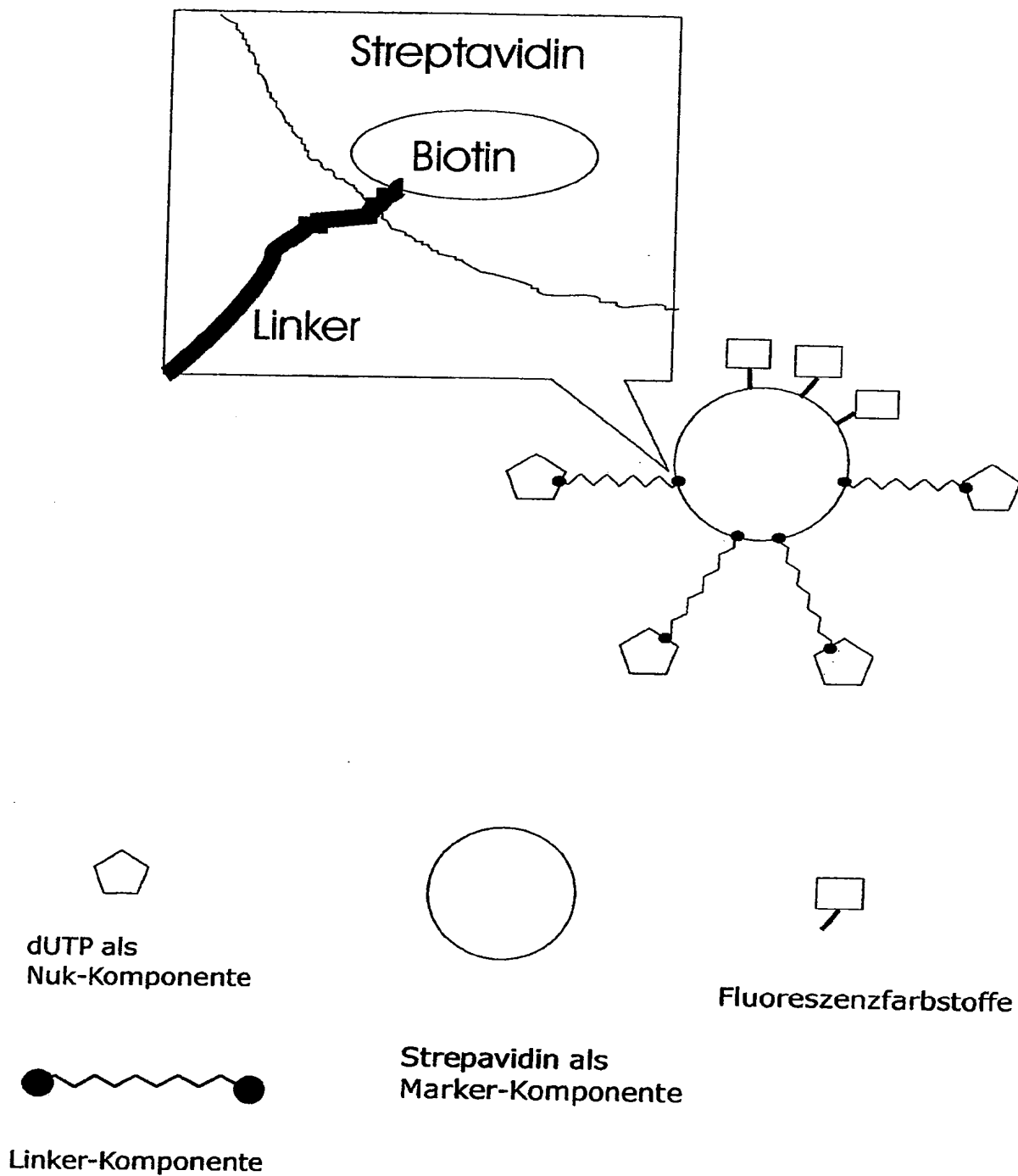
32/51

Fig. 31 B



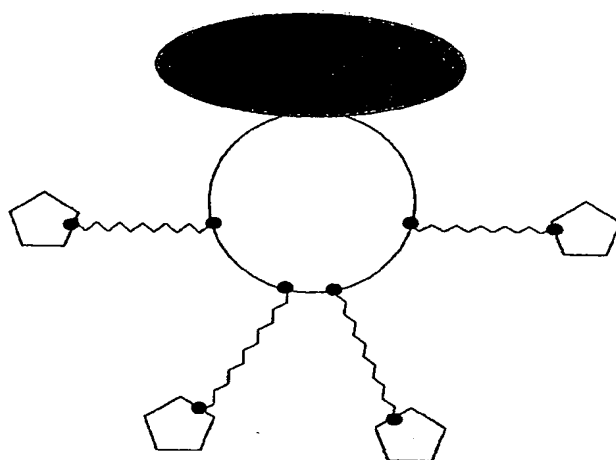
33/51

Fig. 32



34/51

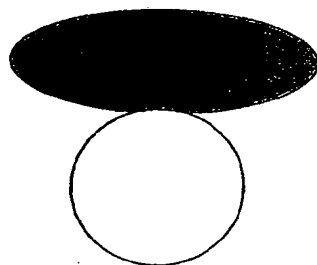
Fig. 33



dUTP als
Nuk-Komponente



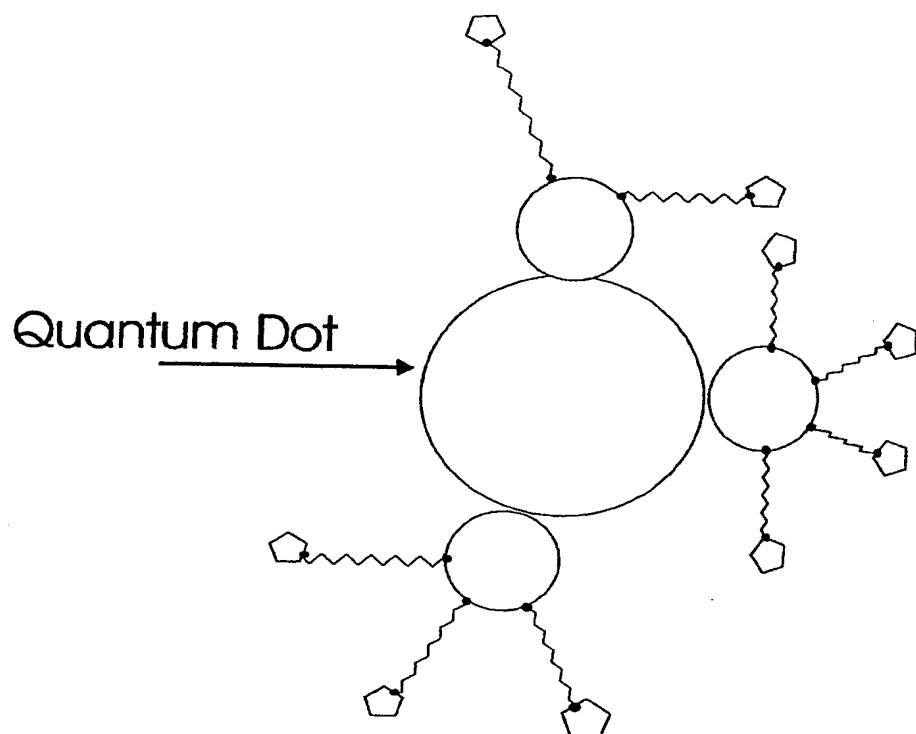
Linker-Komponente



Streptavidin-Enzymkonjugat
als Marker-Komponente

35/51

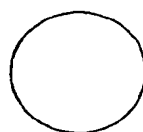
Fig. 34



dUTP als
Nuk-Komponente



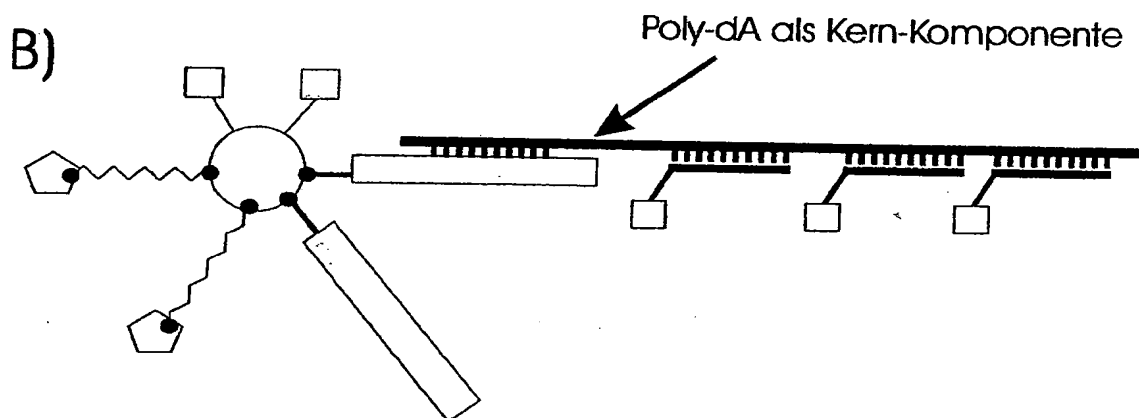
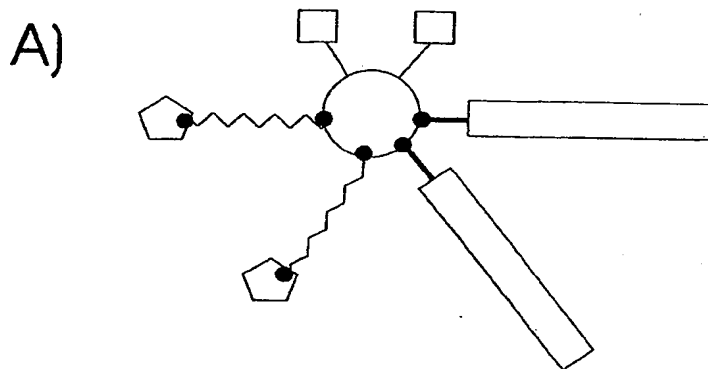
Linker-Komponente




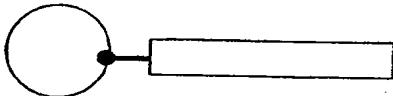
Streptavidin gekoppelt an
Quantum Dot

36/51


Fig. 35





dUTP als
Nuk-Komponente


Streptavidin-Oligonucleotid
als Marker-Komponente


Fluoreszenzfarbstoffe

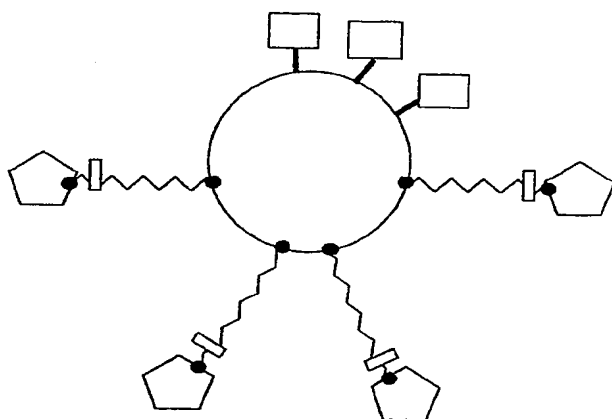

Linker-Komponente


markiertes Oligonukleotid
als Marker-Einheit

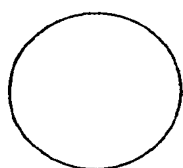
ERSATZBLATT (REGEL 26)

37/51

Fig. 36



dUTP als
Nuk-Komponente



Streptavidin als
Marker-Komponente



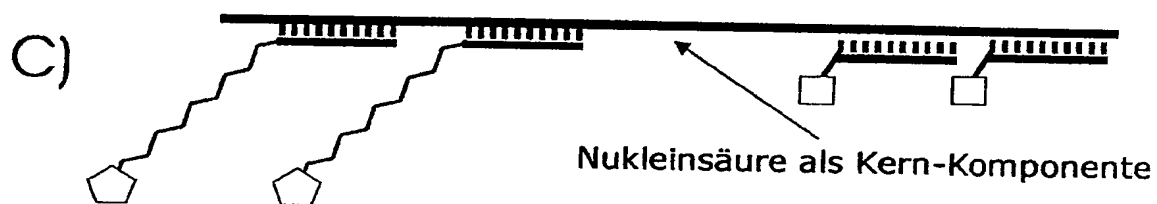
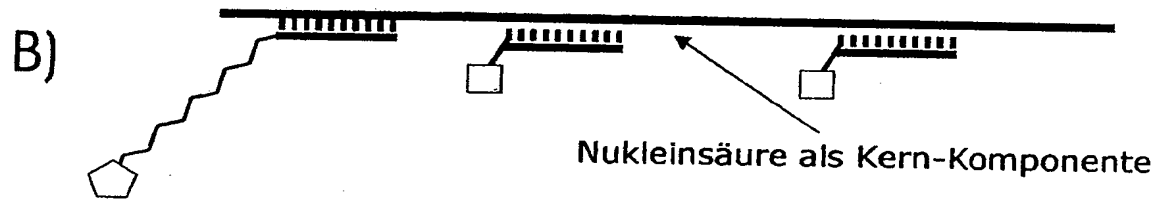
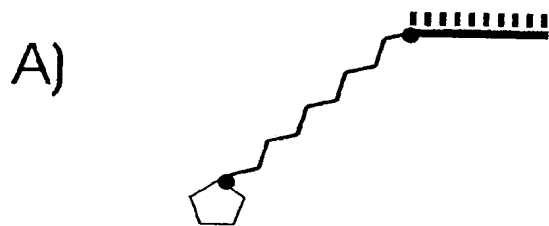
Fluoreszenzfarbstoffe



Linker-Komponente mit
einer spaltbaren Verbindung

38/51

Fig. 37



als Nuk-Komponente dCTP



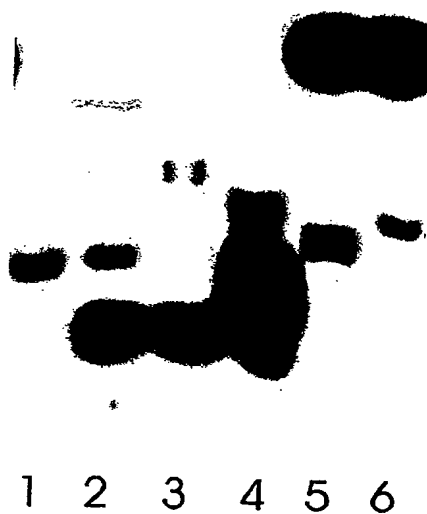
Oligonukleotid dT30



Linker-Komponente

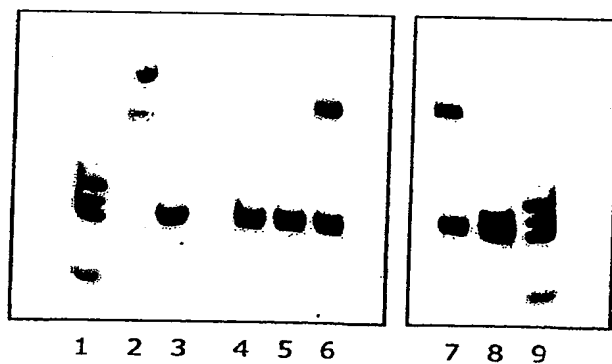
39/51

Fig. 38



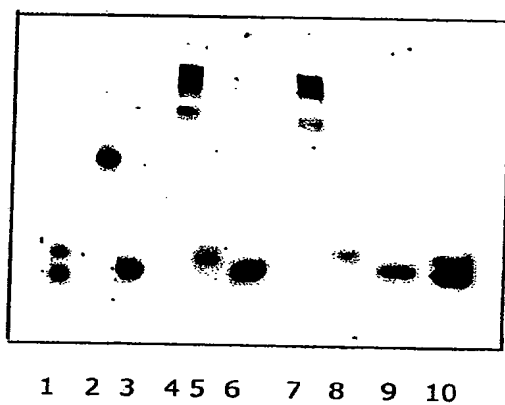
40/51

Fig. 39



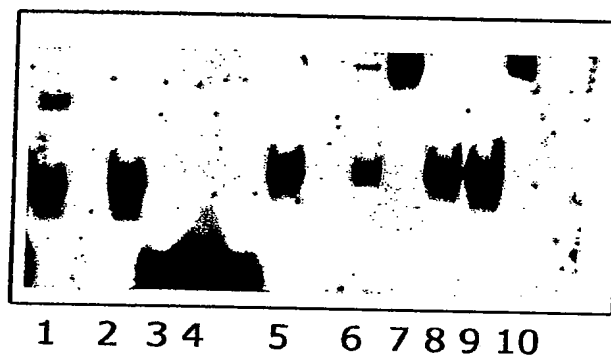
41/51

Fig. 40



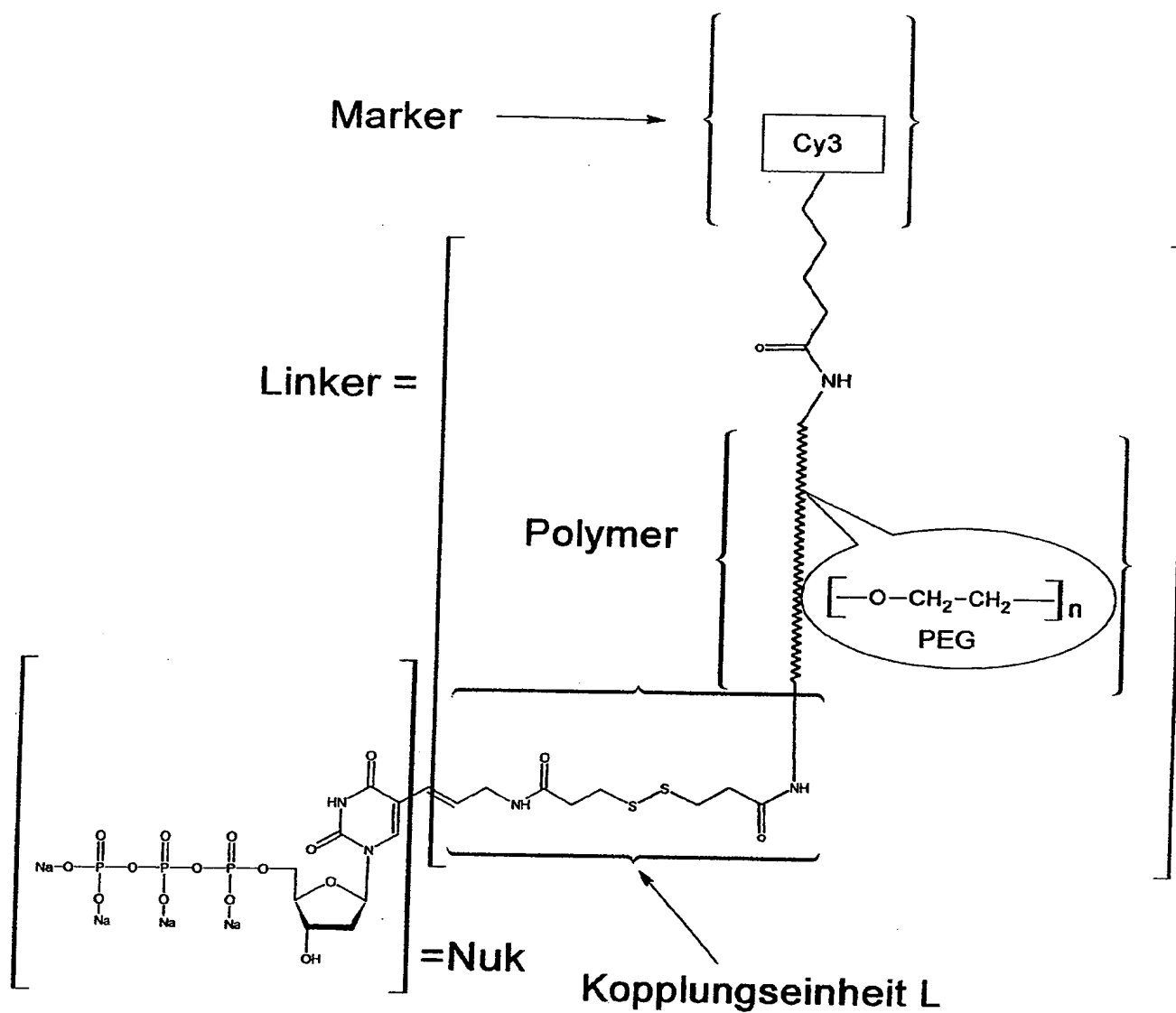
42/51

Fig. 41



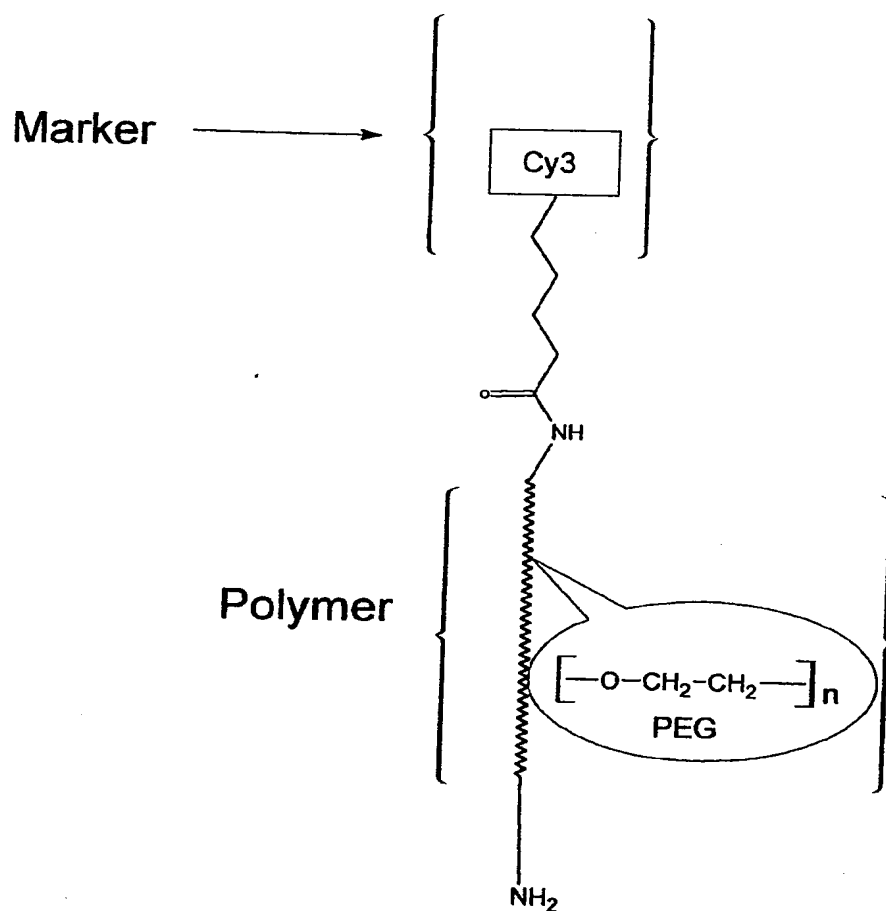
43/51

Fig. 42 A



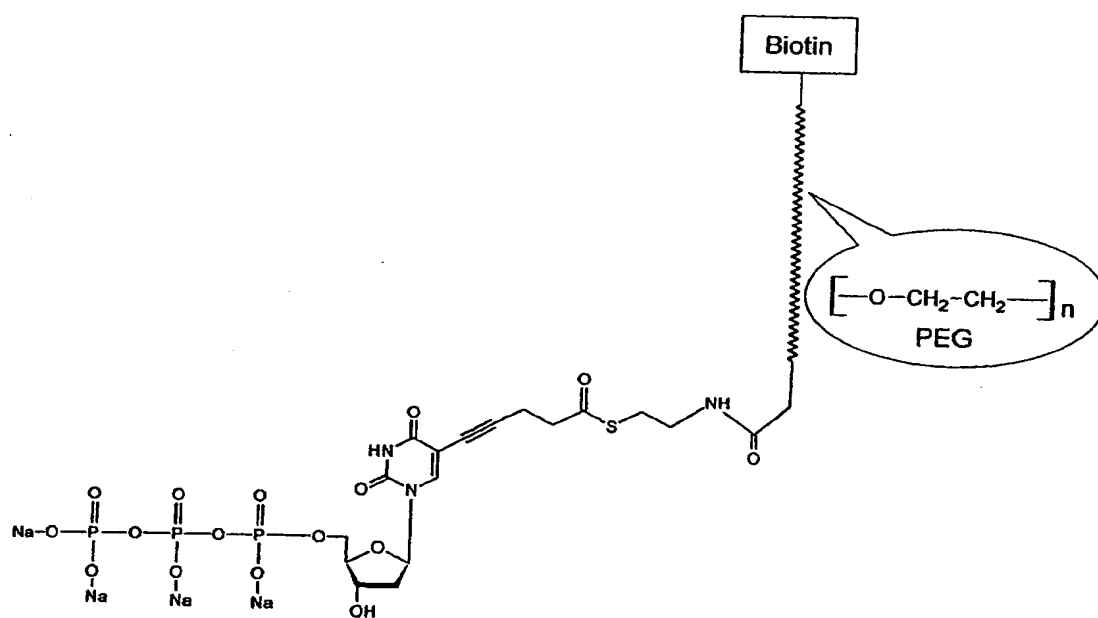
44/51

Fig. 42 B



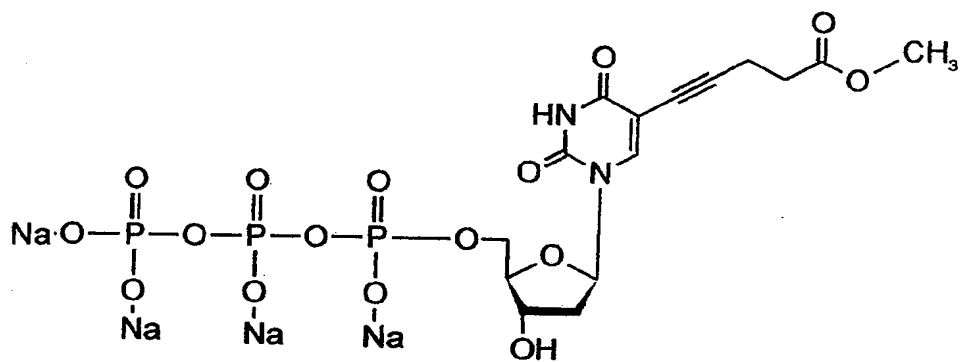
45/51

Fig. 43



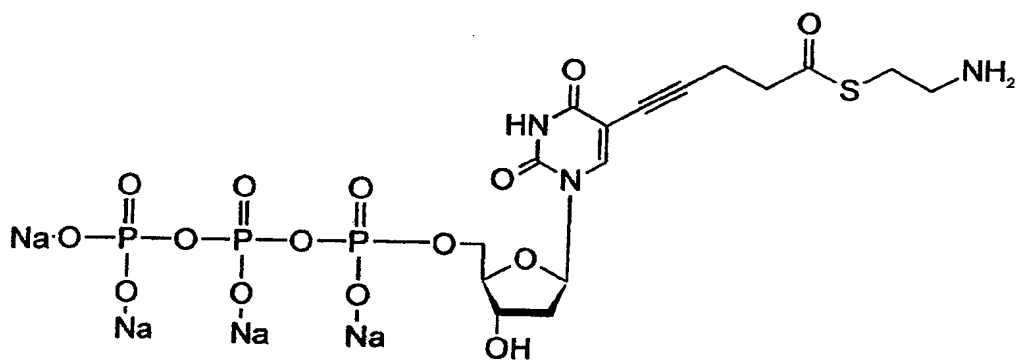
46/51

Fig. 44



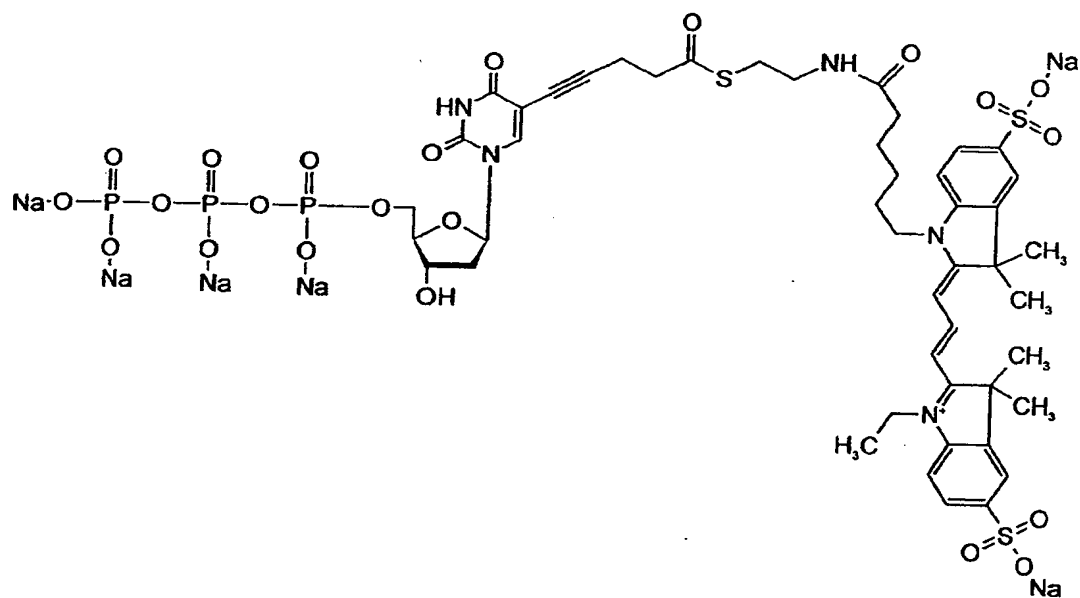
47/51

Fig. 45



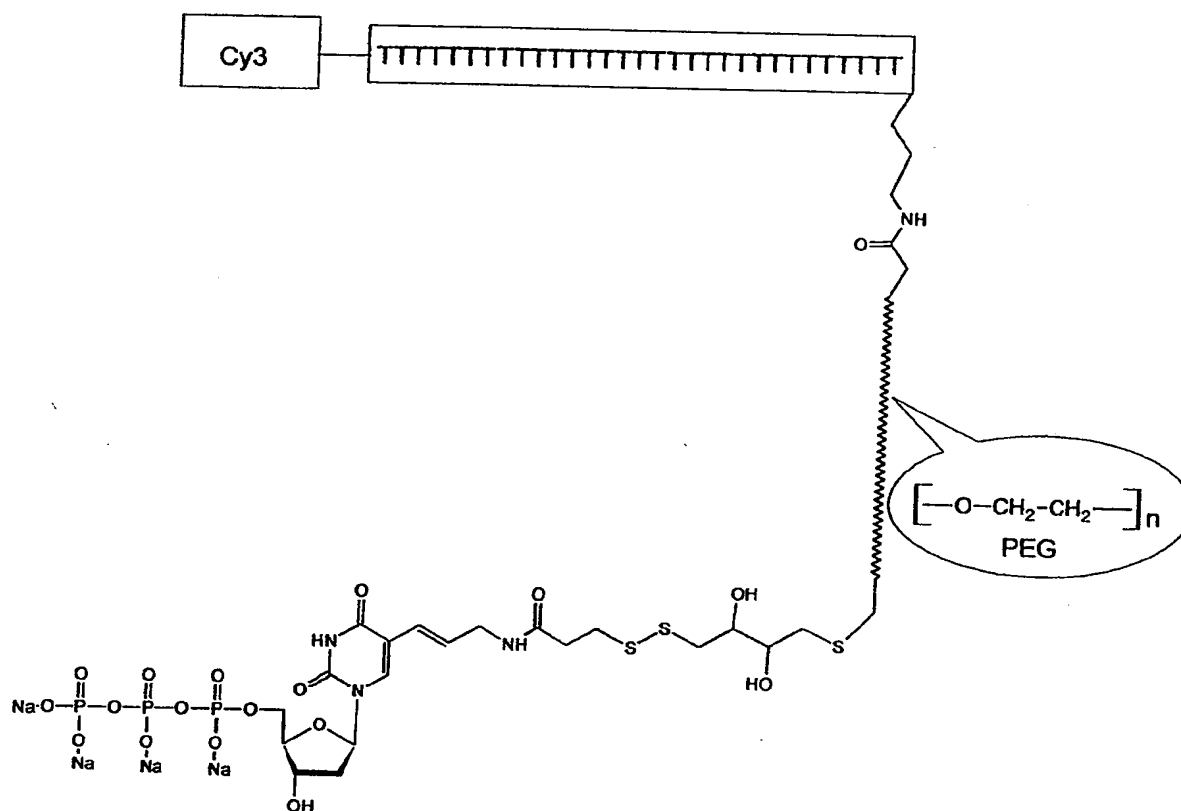
48/51

Fig. 46



50/51

Fig. 48



51/51

Fig. 49

